Streszczenie w języku polskim

Badania epidemiologiczne dotyczące otyłości oraz nadwagi pokazują iż jest to znaczący, wciąż rosnący problem osiągający status globalnej epidemii. Jedną z głównych przyczyn wzrastającej liczby ludzi otyłych jest nieprawidłowy sposób odżywiania i siedzący tryb życia. W ostatnich latach udowodniono, iż tkanka tłuszczowa poza magazynowaniem energii, pełni również rolę endokrynną wydzielając szereg tzw. mediatorów insulinooporności, do których należą np. wolne kwasy tłuszczowe (FFA), leptyna, czynnik martwicy guzów (TNF-α), interleukina 6 (IL-6), adiponektyny, rezystyna i inne.

Wyższe stężenia FFA w osoczu, obserwowane w otyłości i na skutek spożywania HFD prowadzi do wzrostu wychwytu kwasów tłuszczowych przez tkanki biorące udział w regulacji homeostazy glukozy (mięśnie szkieletowe, wątroba, mięsień sercowy, trzustka). Zwiększony napływ FFA który przewyższa zdolności oksydacyjne komórek prowadzi do akumulacji wewnątrzkomórkowych lipidów, co w konsekwencji negatywnie wpływa na funkcję metaboliczną tych tkanek.

Mięśnie szkieletowe, tkanka tłuszczowa i wątroba odgrywają kluczową rolę w metabolizmie glukozy i lipidów, dlatego też metaboliczne zmiany zachodzące w tych tkankach, przyczyniają się do indukcji insulinooporności. Fakt, że mięśnie szkieletowe odpowiedzialne są za 70-80% całkowitego insulinozależnego wychwytu glukozy, spowodował że wielu naukowców skupia się na wyjaśnieniu mechanizmu obniżenia wrażliwości na insulinę właśnie tych tkanek. Początkowo przypuszczano, że to wewnątrzmięśniowe triacyloglicerole (IMTG) są odpowiedzialne za indukcję insulinooporności. Obecnie jednak uwaga skupiona jest głównie na lipidach biologicznie aktywnych, które są w stanie zahamować, bądź aktywować enzymy, bezpośrednio wpływające na działanie szlaku insulinowego i przez to regulują translokację glukotransportera 4 (GLUT4) do błony komórkowej. Do tych lipidów, obok długołańcuchowych estrów acylo-CoA (LCACoA) i ceramidów (Cer) należą również diacyloglicerole (DAG). Do tej pory nie ustalono który z tych lipidów jest najbardziej odpowiedzialny za rozwój insulinooporności oraz w jaki sposób się do tego przyczynia.

W związku z powyższym, celem tej pracy było wyjaśnienie roli DAG w indukowaniu insulinooporności mięśni szkieletowych. Aby osiągnąć zamierzony cel, przeprowadzono miejscowe wyciszenie *in vivo*, genu GPAT1 w mięśniach szkieletowych, za pomocą plazmidów shRNA i zbadano wpływ wyciszenia tego genu na akumulację biologicznie aktywnych lipidów oraz szlak sygnalizacji insuliny w mięśniu brzuchatym łydki myszy z wyindukowaną dietą HFD insulinoopornością.

Eksperyment przeprowadzono na samcach myszy szczepu C57BL/6 (Jackson Laboratory Bar Harbor, Maine, USA). Wyodrębnione zostały następujące grupy doświadczalne (n=8 w każdej grupie):

1. grupa zwierząt karmiona dietą standardową (70% węglowodanów, 10% tłuszczy, 20% białek - Research Diets INC D12450J); u których do mięśni brzuchatych łydki obu nóg podano plazmidy niewyciszające ;

2. grupa zwierząt karmiona dietą bogatotłuszczową (HFD) (20% węglowodanów, 60% tłuszczy i 20% białka - Research Diets INC, D12492)), u których w mięśniu brzuchatym łydki jednej z kończyn wyciszono, przy użyciu specyficznych plazmidów, gen kodujący GPAT1

($HFD_{(-GPAT)}$), a mięsień drugiej łapy stanowił kontrolę ($HFD_{(+GPAT)}$), którym podano plazmid niewyciszający.

Wszystkie zwierzęta były karmione odpowiednią dietą przez okres 8 tygodni.

Dwa tygodnie przed uśmierceniem, zwierzętom wykonano doustny test obciążenia glukozą (OGTT), natomiast tydzień później test tolerancji insuliny (IPTT).

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 (pod wpływem insuliny). Po zakończeniu dożylnej infuzji, zwierzęta były poddane eutanazji. Mięsień brzuchaty łydki został pobrany i zamrożony w ciekłym azocie i był przechowywany do czasu analiz w temperaturze -80 °C.

Oznaczanie stężenia lipidów w mięśniach zostało oznaczone przy użyciu ultrasprawnej chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrem masowym (UHPLC/MS/MS). Natomiast poziom i stopień fosforylacji białek szlaku insulinowego oznaczone zostały za pomocą metody Western Blotting. Poziom ekspresji GPAT1 w wyizolowanym mRNA został oznaczony przy użyciu RT-PCR. Stężenie insuliny w osoczu zostało oznaczone metodą ELISA a poziom glukozy mierzono przy użyciu glukometru AccuChek Aviva.

Podsumowując, spożycie HFD prowadzi do indukcji insulinooporności, o czym świadczy zwiększone stężenie glukozy i insuliny na czczo, nieprawidłowa tolerancja glukozy, zmniejszona odpowiedź na insulinę, wzrost HOMA-IR i zmniejszony wychwyt glukozy w mięśniach w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto uzyskane wyniki badań wskazują, że spożycie HFD prowadzi do wzrostu stężenia FFA w osoczu i wzrostu poziomu lipidów: LCACoA, ceramidów, DAG, TG i acylokarnityn w mięśniach szkieletowych. Wzrost poziomu aktywnych biologicznie lipidów prowadzi do zahamowania szlaku insuliny, o czym świadczy spadek poziomu i / lub stopnia fosforylacji białek szlaku insulinowego, co skutkuje zmniejszeniem wychwytu glukozy w mięśniach. Wyciszenie genu GPAT w mięśniach zwierząt karmionych HFD prowadzi do spadku poziomu DAG i TG, co zwiększyło aktywność szlaku insuliny i poprawiło wychwyt glukozy.