

УДК 577.152.311

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ САХАРОЗЫ НА УРОВНИ мРНК ЭЛОНГАЗ И ДЕСАТУРАЗ И АКТИВНОСТЬ ЭТИХ БЕЛКОВ В ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРЫСЫ

© 2021 Я. Драг^{1*}, М. Кнапик-Чайка¹, А. Гаведзка¹, И. Гдула-Аргасинска², Е. Яцкевич¹

¹ Department of Biochemical Analytics, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland; E-mail: jagoda.drag@uj.edu.pl

² Department of Radioligands, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland

Поступила в редакцию 07.10.2020

После доработки 09.02.2021

Принята к публикации 09.02.2021

В жировой ткани (АТ) структура жирных кислот (ФА) может подвергаться изменениям в результате действия элонгаз и десатураз. Регуляция активности этих ферментов обеспечивается различными факторами, в том числе питательными веществами. Целью исследования была оценка влияния диеты с высоким содержанием сахарозы (HSD; 68% сахара) на уровни мРНК элонгаз (*Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*) и десатураз (*Fads1*, *Fads2*, *Scd*) и определение активности соответствующих белков в АТ крыс. Самцы крыс линии Wistar были случайным образом разбиты на две группы. В первой группе (HSD) их кормили пищей с высоким содержанием сахарозы, а в другой они получали стандартный пищевой рацион (ST). Уровни мРНК определяли с помощью метода полуколичественной ПЦР с обратной транскриптазой. Состав ФА анализировали с помощью газовой хроматографии, и соотношения ФА использовали для оценки активности ферментов. У крыс из группы HSD уровни мРНК для *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1* и *Scd* были выше, а уровень мРНК *Fads2* ниже, чем в группе ST. Повышенные уровни мРНК для *Elovl5* и *Elovl6* соответствовали относительно более высокой активности этих ферментов, в то время как снижение уровня мРНК *Fads2* ассоциировалось с пониженной активностью этой десатуразы. Напротив, повышение уровня мРНК *Scd* сопровождалось снижением активности соответствующего фермента. В АТ крыс группы HSD было обнаружено меньше мононенасыщенных ФА, чем в группе ST. Выявлены различия в составе индивидуальных ФА между группами. Это исследование поддерживает идею о том, что регуляция уровней мРНК и активности как элонгаз, так и десатураз играет важную роль в формировании липидного состава АТ в ответ на изменения в пищевом рационе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: элонгазы, десатуразы, жирные кислоты, диета с высоким содержанием сахарозы, жировая ткань.

DOI: 10.31857/S0320972521050018

ВВЕДЕНИЕ

Белая жировая ткань (WAT) хранит большое количество жирных кислот (ФА) в форме внутриклеточных отложений триацилглицери-

Принятые сокращения: АТ – жировая ткань; ВАТ – бурая жировая ткань (brown adipose tissue); ChREBP – белок, связывающий элементы, реагирующие на углеводы (carbohydrate-responsive element-binding protein); ELOVL – элонгаза; ФА – жирная кислота; FADS1 и FADS2 – десатуразы жирных кислот 1 и 2; HSD – диета с высоким содержанием сахарозы; LXR – печёночный рецептор X (liver X receptor); MUFA – мононенасыщенная жирная кислота; PUFA – полиненасыщенная жирная кислота; SAT – насыщенная жирная кислота; SCD – стеароил-КоА-десатураза; SREBP-1c – белок, связывающий регуляторный элемент стерола 1c (sterol regulatory element-binding protein 1c); ST – стандартный пищевой рацион; TG – триацилглицерин; UNSAT – ненасыщенная жирная кислота; WAT – белая жировая ткань; eWAT – белая жировая ткань придатка яичка.

* Адресат для корреспонденции.

на (TG), которые составляют до 85% массы WAT. Преобладающими компонентами TG, хранящимися в WAT, являются ФА, такие как C14 : 0, C16 : 0, C16 : 1 n-7, C18 : 0, C18 : 1 n-9 и 18 : 2 n-6, которые в сумме составляют до 90% от общего количества ФА, входящих в состав TG [1].

Жирные кислоты присутствуют в адипоцитах в основном после приёма пищи и последующего гидролиза TG сывороточных липопротеинов (хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности), катализируемого липопротеинлипазой (LPL). Также они образуются в результате синтеза *de novo* из ацетил-КоА (липогенез *de novo* или DNL). Основным субстратом липогенеза *de novo* является глюкоза, которая поступает через инсулинзависимый глюкозный транспортёр 4-го типа (GLUT 4) [2].

В жировой ткани (АТ) структура ФА может подвергаться изменениям под воздействием эндогенных ферментов, таких как элонгазы и де-

сатуразы, с образованием нескольких видов липидов. Элонгация и десатурация FA являются двумя ключевыми метаболическими путями биосинтеза насыщенных (SAT), мононенасыщенных (MUFA) и полиненасыщенных жирных кислот (PUFA) [2–4].

В клетках млекопитающих удлинение цепи FA на два атома углерода (элонгация) происходит в основном в эндоплазматическом ретикулуме. Для этого процесса необходим малонил-КоА в качестве донора двух атомов углерода и NADPH в качестве восстанавливающего агента. Начальная реакция конденсации, контролирующая скорость, катализируется элонгазами, называемыми ELOVL (для удлинения очень длинных FA). Связанные с мембраной элонгазы взаимодействуют с 3-кетацил-КоА-редуктазой, дегидратазой и транс-2,3-еноил-КоА-редуктазой для удлинения FA [5].

В семейство элонгаз входит семь членов (ELOVL1–ELOVL7). Гены *Elovl1*, *Elovl5* и *Elovl6* экспрессируются в различных тканях, в то время как *Elovl2*, *Elovl3*, *Elovl4* и *Elovl7* показывают чёткую тканеспецифичную картину экспрессии. ELOVL1 катализирует образование насыщенных жирных кислот (SAT), содержащих до 26 атомов углерода, и этот фермент преимущественно экспрессируется в мозге. ELOVL2 удлиняет молекулы PUFA, таких как C20 : 4 n-6, C20 : 5 n-3, C22 : 5 n-3 и демонстрирует ограниченный паттерн экспрессии генов с наивысшими уровнями мРНК в семенниках и печени и в меньшей степени в WAT, головном мозге и почках. ELOVL3 катализирует образование SAT и MUFA длиной до 24 атомов углерода и в основном экспрессируется в бурой жировой ткани (BAT). ELOVL4 участвует в биосинтезе насыщенных жирных кислот с очень длинной цепью (VLCFA), C28 и C30, а также в синтезе очень длинных полиненасыщенных жирных кислот (VLCPUFA) C28–C38. Этот фермент специфически экспрессируется в сетчатке и в меньшей степени в мозге, семенниках, тимусе и коже. ELOVL5 участвует в элонгации C18–C20 PUFA, и наивысшие уровни соответствующей мРНК были выявлены в печени, семенниках, надпочечниках и WAT. ELOVL6, который удлиняет C12–C16 SAT, экспрессируется в WAT, BAT, печени и мозге. ELOVL7 представляет собой элонгазу VLCFA, которая была идентифицирована совсем недавно. Этот фермент участвует в удлинении SAT, содержащих до 24 атомов углерода, и экспрессируется на высоком уровне в почках, поджелудочной железе, надпочечниках и простате [6–8].

Введение двойных связей в цепь FA (десатурация) происходит в эндоплазматическом рети-

кулуме. Этот процесс требует наличия молекулярного кислорода, NADPH, флавопротеина (цитохром-*b5* редуктаза) и акцептора электронов (цитохром-*b5*). Десатурация жирных кислот катализируется мембраносвязанными ацил-КоА-десатуразами, в состав которых в основном входят десатураза жирных кислот 1 (FADS1), десатураза жирных кислот 2 (FADS2) и стеароил-КоА-десатураза (SCD). FADS1 и FADS2 принимают участие в биосинтезе длинноцепочечных полиненасыщенных FA. Их основными субстратами являются полиненасыщенные жирные кислоты C16–C24 PUFA, преимущественно 18 : 2 n-6 и 18 : 3 n-3 [9]. Начальный этап Δ6-десатурации рассматривается как реакция, ограничивающая скорость биосинтеза PUFA, которая включает чередующееся действие десатураз (FADS1 и FADS2) и элонгаз (ELOVL2 и ELOVL5). SCD является ключевым ферментом биосинтеза MUFA, в основном олеата (18 : 1 n-9) и пальмитолеата (16 : 1 n-7) [10, 11].

Было установлено, что экспрессия генов элонгаз и десатураз регулируется преимущественно на уровне транскрипции различными факторами, включая питательные вещества и гормоны. Экспрессия генов элонгаз и десатураз регулируется непосредственно связыванием факторов транскрипции, таких как белок, связывающий элементы, реагирующие на углеводы (ChREBP) [12–14], печёночный рецептор X (LXR) [15, 16], белок, связывающийся с элементом регуляции стеролов (SREBP) и рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR) со специфическими чувствительными элементами промоторов генов [4, 5 17]. Строгий контроль экспрессии генов элонгаз и десатураз достигается за счёт комбинированного действия различных факторов транскрипции.

Большинство исследований по изучению влияния различных пищевых рационов на активность элонгаз и десатураз проводилось на культурах клеток печени или гепатоцитов. На настоящий момент было показано, что в первичных гепатоцитах глюкоза способствует повышению уровня мРНК для *Elovl6* и *Scd*, а инсулин повышает уровни мРНК для *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* [4]. Экспрессию гена *Scd1* в печени мышей индуцировали кормлением голодных мышей обезжиренной высокоуглеводной пищей [18]. Также было показано, что экспрессия и активность печёночных элонгаз (ELOVL1, ELOVL2, ELOVL5, ELOVL6) и десатураз (FADS1, FADS2, SCD) изменялась у взрослых крыс-самцов после потребления ими пищи с высоким содержанием углеводов с добавкой оливкового масла (10%, w/w) и рыбьего жира (10%, w/w) [14]. Однако данные о влиянии

обогащённой сахарозой диеты (HSD) на элонгазы и десатуразы в АТ ограничены.

Целью настоящего исследования было оценить влияния HSD (68% сахарозы) на относительные уровни мРНК *Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* в белой жировой ткани придатка яичка крысы (eWAT). Нами были отображены гены *Elovl2*, *Elovl5* и *Elovl6*, так как ранее экспрессия этих генов была продемонстрирована в WAT и является предметом регуляции питания. Кроме того, были определены относительные активности (выраженные в виде индексов — соотношения отдельных FA) ELOVL5, ELOVL6, FADS2 и SCD. Также был определен состав FA жировой ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Крысы-самцы (6 недель) линии Wistar весом 151 ± 3 г были приобретены в питомнике фармацевтического факультета Ягеллонского университета. Животных содержали в отдельных клетках в стандартных условиях искусственного светового режима: 12 ч свет/темнота при постоянной комнатной температуре (21–23 °С). Крысам был предоставлен неограниченный доступ к пище и воде. Животные (12 крыс) были случайным образом разбиты на две группы: (1) экспериментальная группа ($n = 6$), получавшая HSD (68% сахароза, MP Biomedicals, 960236, США) и (2) контрольная (ST) группа ($n = 6$), питающаяся стандартной пищей (55% углеводов, Murigran, Concentrate and Mix Feed Factory AGROPOL, Мотыч, Польша). Животных кормили до достижения ими веса в 250 г (21 день в группе HSD и 25 дней в группе ST). Не было выявлено изменений в их внешнем виде или поведении. Затем крыс умерщвляли и вырезали белую жировую ткань придатков яичка (eWAT). Ткань замораживали с помощью

алюминиевых шипцов, предварительно охлажденных в жидком азоте. До проведения анализа все образцы хранили при -80 °С.

Определение уровня мРНК для элонгаз и десатураз. Относительные уровни мРНК для *Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* в eWAT оценивали с помощью полуколичественной полимеразной цепной реакции с использованием обратной транскриптазы. Препарат общей РНК из жировой ткани получали с помощью реагента TRI («Sigma-Aldrich», Германия), а затем синтезировали кДНК с использованием 1 мкг общей РНК, обратной транскриптазы и олигодТ-праймеров, входящих в RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва). кДНК амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы OptiQ («Euro», Польша) согласно инструкциям производителя. Для проведения ПЦР в реакционную смесь добавляли 1,2 мкл кДНК и 1,6 мкл специфических для каждого гена праймеров (табл. 1), которые были предсказаны с помощью программы Primer3 (v. 0.4.0; NCBI, США). В работе использовали Mastercycler gradient EP 5331 («Eppendorf», Германия). Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5%-ном агарозном геле, окрашивали этидиумбромидом и проводили денситометрию с помощью программы Quantity One 4.2.1. («Bio-Rad», США). Полученные данные нормализовали относительно β -актина как внутреннего контроля (в таком же образце). После выделения общей РНК были проведены две независимых ПЦР с обратной транскриптазой. Количество циклов ПЦР для всех протестированных ферментов было равно 35.

Экстракция липидов и определение содержания жирных кислот (FA) в жировой ткани. Общий экстракт липидов из eWAT получали по методу Folch [19]. Синтез метиловых эфиров жирных кислот (FAME) проводили с использованием 14%-ного BF_3 в метаноле согласно методу

Таблица 1. Праймеры, использованные для проведения ПЦР

Название гена (символ)	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Концентрация; прямой/обратный праймер (мкМ)	Длина продукта (п.н)
<i>Elovl2</i>	TCAACAATGGCAGCTCAAAG	GGGGGATTTACTTGGGAAAA	4/4	249
<i>Elovl5</i>	GAGGCATCCTGGTGGTGTAT	ACGTGCAGGACTGTGATCTG	4/4	247
<i>Elovl6</i>	GCTACAACGGAGCAGAGGAC	CCATTTTCAAGCCAACCAGT	4/4	247
<i>Fads1</i>	GAAGGAACAGCAGTCCAAGC	GTCTGGACTCGTGGAAGAGC	4/4	185
<i>Fads2</i>	ATCTGCCCTACAACCACCAG	TGTGACCCACACAAACCAGT	4/4	248
<i>Scd</i>	CTGTTAGCCCAGCCTCACTC	GTCTGCAGGAAAACCTCTGC	2/2	668
<i>β-actin</i>	AGCCATGTACGTAGCCATCC	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	4/4	228

Таблица 2. Проанализированные жирные кислоты

Группа	FA
SAT	12 : 0, 14 : 0, 15 : 0, 16 : 0, 17 : 0, 18 : 0, 21 : 0
UNSAT	14 : 1, 16 : 1 n-7, 17 : 1, 18 : 1 n-9, 18 : 2 n-6, 18 : 3 n-6, 18 : 3 n-3, 20 : 3 n-6, 20 : 4 n-6, 20 : 5 n-3, 22 : 6 n-3
MUFA	14 : 1, 16 : 1 n-7, 17 : 1, 18 : 1 n-9
PUFA	18 : 2 n-6, 18 : 3 n-6, 18 : 3 n-3, 20 : 3 n-6, 20 : 4 n-6, 20 : 5 n-3, 22 : 6 n-3

Metcalfе и Schmitz [20]. Полученные FAME анализировали с помощью метода газовой хроматографии Agilent 6890N («Agilent», США) с использованием пламенно-ионизационного детектора (FID – flame ionization detector) и колонки DB-23 (60 м × 0,25 мм), как было описано ранее [21, 22], и идентифицировали с использованием Supelco® 37 Component FAME Mixstandards («Sigma-Aldrich»). Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения ChemStation («Agilent Technologies», Германия). Для каждого образца содержание отдельных жирных кислот выражали в виде процента от общего количества жирных кислот. Жирные кислоты были разбиты на группы, обозначаемые как SAT, UNSAT (ненасыщенные жирные кислоты), MUFA и PUFA (табл. 2).

Индексы элонгации, десатурации и липогенеза de novo. Для оценки относительной активности отдельных элонгаз и десатураз были использованы индексы, выраженные в виде соотношения концентраций конкретных жирных кислот [23, 24]. Индексы для SCD (C16) и SCD (C18) описывают активность SCD в процессе десатурации жирных кислот C16 и C18 соответственно. Оценка индекса FADS1, как соотношения 20 : 4 n-6 и 20 : 3 n-6, оказалась невозможной из-за отсутствия в хроматограммах пика, соответствующего 20 : 4 n-6.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных была проведена с помощью программ STATISTICA 13 и GraphPad Prism v. 5.02. Для оценки нормализации использовали критерий Шапиро–Вилк. Односторонний дисперсионный анализ ANOVA и критерий Тьюки использовались для оценки уровня мРНК для всех элонгаз и десатураз, индексов (такие как SAT, UNSAT, PUFA и MUFA), состава жирных кислот 16 : 0, 16 : 1, 18 : 0, 18 : 2 n-6, 18 : 3 n-6, 18 : 3n-3 и индексов для ELOVL5 и ELOVL6 и FADS2 (данные представлены в виде среднего значения ± SD). U-критерий Манна–Уитни был использован для анализа состава жирных кислот 12 : 0, 14 : 0, 14 : 1, 15 : 0, 17 : 0, 17 : 1, 18 : 1 n-9, 21 : 0, 20 : 3 n-6 и индексов для

SCD (C16) и SCD (C18) (данные представлены в виде среднего значения и разброса). Приемлемый уровень достоверности был установлен как $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка уровня мРНК для элонгаз и десатураз.

В группе HSD уровень мРНК *Elovl2* был понижен на 21% по сравнению с группой ST. Уровни мРНК *Elovl5* и *Elovl6* были на 43% и 16% выше по сравнению с контролем. Выявленные различия в случае *Elovl5* и *Elovl6* были статистически достоверны (рис. 1).

Уровень мРНК *Fads2* в группе HSD снизился на 23% по сравнению с группой ST. Напротив, уровни мРНК для *Fads1* и *Scd* были на 22% и 69% выше соответственно, чем в контрольной группе. Выявленные различия в уровне мРНК для *Fads1*, *Fads2* и *Scd* были статистически достоверны (рис. 1).

FA-состав белой жировой ткани придатков яичка. В жировой ткани крыс группы HSD со-

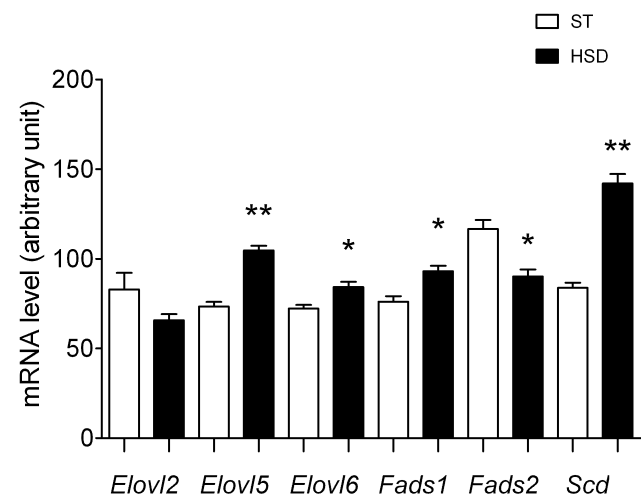


Рис. 1. Относительные уровни мРНК для генов *Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, *Fads2* и *Scd* в eWAT у крыс из группы HSD ($n = 6$) и контрольной (ST) группы ($n = 6$); * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$

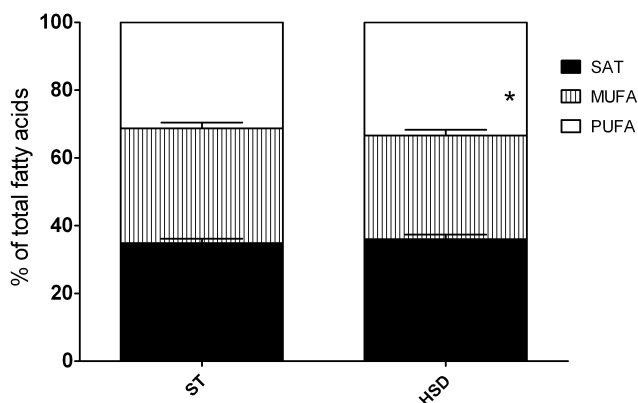


Рис. 2. Средние значения индексов SAT, PUFA и MUFA в eWAT крыс группы HSD ($n = 6$) и контрольной группы (ST) ($n = 6$); * $p < 0,01$

держание SAT увеличилось на 3%, а содержание ненасыщенных жирных кислот (UNSATs) уменьшилось на 2% по сравнению с группой ST. Средний уровень PUFA был на 7% выше в группе HSD, чем в контрольной группе. Средний уровень MUFA был на 10% ниже, чем в группе ST, и выявленные различия были статистически достоверны (рис. 2).

Процентное содержание отдельных жирных кислот у крыс групп HSD и ST различается. Содержание 16 : 0, 18 : 0 и 18 : 2 n-6 выше в группе

HSD по сравнению с группой ST. Процентное содержание других FA в группе HSD было ниже, чем у контрольных крыс. Выявленные различия были статистически достоверными для всех FA, за исключением 21 : 0 (табл. 3).

В отличие от крыс группы ST, в жировой ткани крыс группы HSD арахидоновая (20 : 4 n-6), эйкозапентаеновая (20 : 5 n-3) и докозагексаеновая (22 : 6 n-3) кислоты обнаружены не были (табл. 3). Типичные хроматограммы представлены на рис. 3.

Активность элонгаз и десатураз. Мы также обнаружили различия в активности (выраженные в виде индексов) элонгаз и десатураз в белой eWAT крыс. В группе HSD индексы FADS2, SCD (C16) и SCD (C18) были понижены на 93, 51 и 16% соответственно по сравнению с группой ST. Индексы ELOVL5 и ELOVL6 были на 828 и 12% выше по сравнению с контролем. Все наблюдаемые различия были статистически достоверными (табл. 4). В группе HSD активность FADS1 не определялась из-за отсутствия FA, необходимой для определения индекса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты этого исследования показывают, что HSD снижает общее содержание MUFA

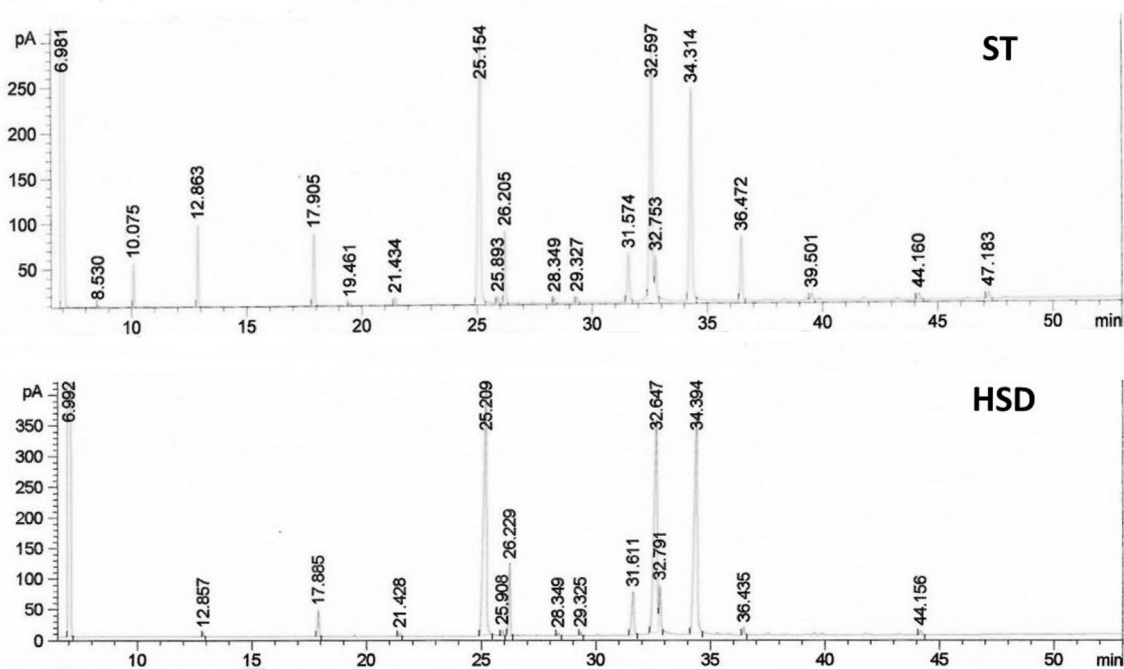


Рис. 3. Типичные хроматограммы для групп ST и HSD

Таблица 3. Содержание FA в процентах и изменения их содержания в группе HSD в сравнении с группой ST

FA	% FA в группе ST	% FA в группе HSD	% FA в группе HSD относительно группы ST
12 : 0	1,1	0,3	↓ 74*
14 : 0	2,9	1,8	↓ 40**
14 : 1	0,2	0,1	↓ 58**
15 : 0	0,5	0,2	↓ 51**
16 : 0	26,6	29,4	↑ 11**
16 : 1 n-7	5,9	4,1	↓ 31*
17 : 0	0,3	0,2	↓ 43**
17 : 1	0,4	0,2	↓ 59**
18 : 0	3,3	4,0	↑ 21***
18 : 1 n-9	27,4	26,3	↓ 4*
18 : 2 n-6	21,7	32,2	↑ 51***
18 : 3 n-6	5,5	0,6	↓ 88***
18 : 3 n-3	0,6	0,2	↓ 68***
21 : 0	0,2	0,2	↓ 26
20 : 3 n-6	0,5	0,4	↓ 28*
20 : 4 n-6	0,7	0,0	–
20 : 5 n-3	0,9	0,0	–
22 : 6 n-3	1,5	0,0	–

Примечание. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Таблица 4. Средние значения индексов элонгаз и десатураз

Фермент	Индекс	ST	HSD
FADS2	18 : 3 n-6/18 : 2 n-6	0,25 ± 0,01	0,01 ± 0,007**
SCD (C16)	16 : 1 n-7/16 : 0	0,23 (0,14-0,27)	0,11 (0,11-0,14)*
SCD (C18)	18 : 1 n-9/18 : 0	8,07 (7,96-9,32)	6,76 (6,04-7,03)*
ELOVL5	20 : 3 n-6/18 : 3 n-6	0,09 ± 0,008	0,91 ± 0,41**
ELOVL6	18 : 0/16 : 0	0,12 ± 0,009	0,14 ± 0,006*

Примечание. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение или в виде медианы (диапазон). * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$.

(сумма мононасыщенных жирных кислот 14 : 1, 16 : 1 n-7, 17 : 1 и 18 : 1 n-9) в eWAT крысы. Уменьшение содержания MUFA можно объяснить более низкой активностью SCD у крыс, получавших рацион, обогащённый сахарозой. Путь биосинтеза MUFA включает стадии, которые катализируются ELOVL6 и SCD. ELOVL6 в основном ответственен за элонгацию 16 : 0 (пальмитиновая кислота) до 18 : 0 (стеариновая кислота), в то время как SCD, фермент, ограничивающий скорость в синтезе MUFA, катализирует десатурацию насыщенных FA C16–C18.

В нашем исследовании относительные уровни мРНК для *Elovl6* и *Scd* в группе HSD были выше, чем в контрольной группе. Известно, что углеводы пищи индуцируют секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы и повышают поглощение глюкозы адипоцитами [25, 26]. Было показано, что в адипоцитах глюкоза и инсулин стимулируют факторы транскрипции LXR α , ChREBP и SREBP-1c (белки, связывающие регуляторный элемент стерола 1c). Глюкоза активирует преимущественно ChREBP, в то время как инсулин активирует LXR α либо прямо, либо через SREBP-1c [27–31]. Эти факторы транскрипции, в особенности ChREBP, регулируют экспрессию элонгаз и десатураз, включая гены *Elovl6* и *Scd* [4]. Мы не измеряли уровни мРНК и белка для LXR α , ChREBP и SREBP-1c, но предполагаем, что HSD стимулирует экспрессию генов *Elovl6* и *Scd*, активируя эти транскрипционные факторы.

В настоящем исследовании было показано, что повышенный уровень мРНК *Elovl6* соответствует более высокой активности ELOVL6. Напротив, повышение содержания мРНК *Scd* сопровождалось снижением активности соответствующего фермента. Нельзя исключить, что активность SCD регулируется на пост-транскрипционном уровне. Tan et al. [32] показали, что miR-199a-3p подавляет активность SCD и изменяет состав FA в адипоцитах 3T3-L1, целенаправленно воздействуя на 3'-UTR гена *Scd*. Было показано, что глюкоза регулирует экспрессию микроРНК из семейства 199a в β -клетках поджелудочной железы [33]. В исследовании Li et al. [34] было показано, что в плазме больных диабетом экспрессия miR-199a-3p повышена по сравнению со здоровыми волонтерами. Мы предполагаем, что HSD может быть ответственным за ингибирование трансляции мРНК *Scd* и снижение активности SCD за счёт повышения уровня miR-199a-3p.

Нами было показано, что в eWAT крыс из группы HSD уровни 16 : 0 и 18 : 0 были значительно выше, а уровни 16 : 1 n-7 и 18 : 1 n-9 были понижены по сравнению с контролем. Эти результаты соответствуют результатам, полученным на моделях нокаутированных животных. Так, мыши со специфическим удалением из жировой ткани SCD1 (AKO), мыши с одновременным удалением SCD1 из печени и АТ (LAKO) и *Scd1*-дефицитные мыши характеризуются выраженным снижением содержания 16 : 1 n-7 и 18 : 1 n-9 и повышением уровня 16 : 0 и 18 : 0 в составе жирных кислот TG жировой ткани [35, 36]. Кроме того, недавно было показано, что пальмитолеиновая кислота контролирует важные метаболические процессы в АТ, та-

кие как повышенный липолиз и поглощение глюкозы, и увеличивает расход энергии за счёт стимуляции цикла TG/FA [37, 38]. Мы предполагаем, что низкое содержание MUFA, особенно пальмитолеиновой кислоты, оказывает отрицательное влияние на метаболизм АТ, включая повышенное накопления TG у крыс из группы HSD.

Мыши с мутациями гена *Scd1* и *Scd1*-дефицитные мыши демонстрируют замечательный гиперметаболический фенотип, который защищает их от ожирения, инсулиновой резистентности и стеатоза печени. Ntambi et al. [39] показали, что мыши с целевым разрушением изоформы SCD1 в меньшей степени страдали от ожирения, они обладали повышенной чувствительностью к инсулину и были устойчивы к увеличению веса, вызванному диетой. Снижение ожирения, вызванного высокоуглеводной диетой, у мышей с печёночно-специфической делецией *Scd1* (LKO) и у *Scd1*-дефицитных мышей было связано с ингибированием экспрессии генов, участвующих в биосинтезе FA. В то же время было обнаружено, что делеция или ингибирование *Scd1* в WAT и BAT оказывают минимальное воздействие на энергетический метаболизм всего организма [35]. Таким образом, мы предполагаем, что снижение активности SCD в eWAT оказывает лишь некоторый локальный эффект, как было описано выше, но не оказывает значительного влияния на метаболизм липидов в организме.

В этом исследовании не было обнаружено различий между группами в содержании PUFA в eWAT. Однако содержание отдельных FA значительно изменялось. Так, у крыс группы HSD было обнаружено повышенное содержание 18 : 2 n-6 и пониженное содержание 18 : 3 n-3 и 18 : 3 n-6 по сравнению с группой ST.

Изменения содержания PUFA можно объяснить снижением уровня мРНК и активности FADS2, который является первым и скоростью-лимитирующим ферментом биосинтеза PUFA [9]. Напротив, уровень мРНК и активность ELOVL5, второго фермента, принимающего участие в синтезе PUFA, были повышены в группе HSD. Недавно было обнаружено, что ELOVL5 катализирует не только элонгацию C18 PUFA (18 : 3 n-6 и 18 : 4 n-3), но также и элонгацию MUFA от 16 : 1 n-7 до 18 : 1 n-7 (вакценовая кислота) [40]. В исследовании наблюдалось значительное снижение количества 18 : 3 n-6 и отсутствие 18 : 4 n-3. Мы предположили, что у крыс, получавших HSD, синтез вакценовой кислоты (18 : 1 n-7), катализируемый ELOVL5, доминирует над реакцией, приводящей к синтезу PUFA. Мы не измеряли содержание вакцено-

вой кислоты; однако мы полагаем, что более высокая активность ELOVL5 приводит к увеличению содержания этого соединения.

Более высокий уровень мРНК *Elovl5* соответствовал повышенной активности ELOVL5. Относительный уровень мРНК *Fads1* в группе HSD был выше по сравнению с контрольной группой, однако в группе HSD не удалось определить активность FADS1 из-за отсутствия конкретной FA, необходимой для расчёта индекса, отражающего активность FADS1.

В печени экспрессия генов *Elovl5*, *Fads1* и *Fads2* регулируется на уровне транскрипции, а именно белками SREBP-1c и LXR [4]. Было показано, что как глюкоза, так и инсулин индуцируют экспрессию LXR α , который является ключевым фактором транскрипции, стимулирующим экспрессию ферментов липогенеза. LXR высоко экспрессируется в АТ [41]. Hua et al. [29] предположили, что LXR α может играть центральную роль в контроле транскрипции с помощью глюкозы и инсулина в адипоцитах. Кроме того, в промоторе гена, кодирующего SREBP-1, имеется сайт связывания LXR α , и, следовательно, SREBP-1c может являться мишенью для LXR α . В целом вполне возможно, что более высокие уровни мРНК *Elovl5* и *Fads1* в АТ крыс группы HSD могут быть ассоциированы с индукцией LXR α и SREBP-1c глюкозой и инсулином. Более низкий уровень мРНК *Fads2* коррелировал с пониженной активностью белка FADS2 в группе крыс HSD, и эти изменения нуждаются в дальнейших исследованиях.

Уровень мРНК *Elovl2* в АТ крыс группы HSD не отличался от её уровня в контрольной группе. Wang et al. [4] показали, что обработка гепатоцитов глюкозой или инсулином не оказывает влияния на уровень экспрессии *Elovl2*. Кроме того, на экспрессию *Elovl2* в печени не влияют голодание и повторное кормление, а также диетические добавки с рыбным или оливковым маслом. Можно предположить, что уровень мРНК *Elovl2* в АТ, как и в печени, не изменяется в ответ на различные диеты.

Как описано в нашем предыдущем исследовании, в группе HSD уровень TG в сыворотке повышается по сравнению с контрольной группой [42], что могло быть результатом как стимулирования синтеза TG в печени, так и снижения деградации TG липазой липопротеинов [43–46].

Результаты этого исследования поддерживают идею о том, что регуляция уровня мРНК и активности элонгаз и десатураз играет важную роль в контроле липидного состава АТ в ответ на изменения в пищевом рационе. Нами было показано, что повышенное потребление углеводов вызывает изменения состава FA в АТ путём сни-

жения содержания MUFA. Кроме того, было показано, что HSD может регулировать гены элонгаз (*Elovl5* и *Elovl6*) и десатураз (*Fads1*, *Fads2* и *Scd*) FA. Чтобы изучить молекулярную основу регуляции экспрессии элонгаз и десатураз в АТ в ответ на изменения в питании, необходимы дальнейшие исследования.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Катаржине Вадовской и Анне Цихон за прекрасную техническую поддержку.

Вклад авторов. Я. Драг и Е. Яцкевич задумали и спланировали эксперименты. Я. Драг, И. Гдула-Аргасинска и М. Кнапик-Чайка прове-

ли эксперименты. Я. Драг провела эксперименты на животных. Я. Драг, М. Кнапик-Чайка и А. Гаведзка проанализировали полученные данные. Я. Драг и М. Кнапик-Чайка написали статью. Все авторы прочли и одобрили окончательный вариант статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры с лабораторными животными были выполнены в соответствии с этическими стандартами института, где было выполнено настоящее исследование (комитет по работе с животными, комитет по этике Ягеллонского университета, 19.11.2009, № 116/2009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jurešić, G. Č., Percan, K., and Broznić, D. (2016) Effect of dietary fatty acid variation on mice adipose tissue lipid content and phospholipid composition, *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.*, **11**, 128-137.
- Beylot, M. (2007) Metabolism of white adipose tissue, in *Adipose Tissue And Adipokines In Health And Disease* (Fantuzzi, G., and Mazzone, T., ed.) Totowa, pp. 21-35, doi: 10.1007/978-1-59745-370-7_2.
- Kunešová, M., Hlavatý, P., Tvrzická, E., Staňková, B., Kalousková, P., et al. (2012) Fatty acid composition of adipose tissue triglycerides after weight loss and weight maintenance: the DIOGENES study, *Physiol. Res.*, **61**, 597-607, doi: 10.33549/physiolres.932414.
- Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., et al. (2006) Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity, *J. Lipid Res.*, **47**, 2028-2041, doi: 10.1194/jlr.M600177-JLR200.
- Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P. G. P., and Jacobsson, A. (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice, *Prog. Lipid Res.*, **49**, 186-199, doi: 10.1016/j.plipres.2009.12.002.
- Kihara, A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders, *J. Biochem.*, **152**, 387-395, doi: 10.1093/jb/mvs105.
- Moon, Y.-A., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2009) Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice, *J. Lipid Res.*, **50**, 412-423, doi: 10.1194/jlr.M800383-JLR200.
- Tripathy, S., Lytle, K. A., Stevens, R. D., Bain, J. R., Newgard, C. B., et al. (2014) Fatty acid elongase-5 (*Elovl5*) regulates hepatic triglyceride catabolism in obese C57BL/6J mice, *J. Lipid Res.*, **55**, 1448-1464, doi: 10.1194/jlr.M050062.
- Zhang, J. Y., Kothapalli, K. S. D., and Brenna, J. T. (2016) Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **19**, 103-110, doi: 10.1097/MCO.0000000000000254.
- ALJohani, A. M., Syed, D. M., and Ntambi, J. M. (2017) Insights into stearoyl-CoA desaturase-1 regulation of systemic metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.*, **28**, 831-842, doi: 10.1016/j.tem.2017.10.003.
- Paton, C. M., and Ntambi, J. M. (2009) Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, 28-37, doi: 10.1152/ajpendo.90897.2008.
- Dentin, R., Denechaud, P. D., Benhamed, F., Girard, J., and Postic, C. (2006) Hepatic gene regulation by glucose and polyunsaturated fatty acids: a role for ChREBP, *J. Nutr.*, **136**, 1145-1149, doi: 10.1093/jn/136.5.1145.
- Ma, L., Robinson, L. N., and Towle, H. C. (2006) ChREBP-Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver, *J. Biol. Chem.*, **281**, 28721-28730, doi: 10.1074/jbc.M601576200.
- Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J., and Jump, D. B. (2005) Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases, *J. Lipid Res.*, **46**, 706-715, doi: 10.1194/jlr.M400335-JLR200.
- Mitro, N., Mak, P. A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., et al. (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor, *Nature*, **445**, 219-223, doi: 10.1038/nature05449.
- Qin, Y., Dalen, K. T., Gustafsson, J. Å., and Nebb, H. I. (2009) Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR α -SREBP-1c, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1791**, 140-147, doi: 10.1016/j.bbalip.2008.12.003.
- Jazurek, M., Dobrzyń, P., and Dobrzyń, A. (2008) Regulation of gene expression by long-chain fatty acids, *Postepy Biochem.*, **54**, 242-250.
- Ntambi, J. M. (1992) Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10925-10930, doi: 10.1016/S0021-9258(19)50107-7.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- Metcalfe, L. D., and Schmitz, A. A. (1961) The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis, *Anal. Chem.*, **33**, 363-364, doi: 10.1021/ac60171a016.
- Chaves Das Neves, H. J., and Vasconcelos, A. M. (1987) Capillary gas chromatography of amino acids, including

- asparagine and glutamine: sensitive gas chromatographic-mass spectrometric and selected ion monitoring gas chromatographic-mass spectrometric detection of the N,O(S)-tert.-butyldimethylsilyl derivativ, *J. Chromatogr.*, **392**, 249-258.
22. Li, Y., and Watkins, B. A. (1998) Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce *ex vivo* prostaglandin E 2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids, *Lipids*, **33**, 417-425, doi: 10.1007/s11745-998-0223-9.
 23. Cedernaes, J., Alsjö, J., Västermark, Å., Risérus, U., and Schiöth, H. B. (2013) Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase 1 index is increased and linoleic acid is decreased in obesity-prone rats fed a high-fat diet, *Lipids Health Dis.*, **12**, 2, doi: 10.1186/1476-511X-12-2.
 24. Harding, S. V., Bateman, K. P., Kennedy, B. P., Rideout, T. C., and Jones, P. J. H. (2015) Desaturation index versus isotopically measured de novo lipogenesis as an indicator of acute systemic lipogenesis, *BMC Res. Notes*, **8**, 49, doi: 10.1186/s13104-015-1016-0.
 25. Gastaldelli, A., Gaggini, M., and DeFronzo, R. A. (2017) Role of adipose tissue insulin resistance in the natural history of type 2 diabetes: results from the San Antonio metabolism study, *Diabetes*, **66**, 815-822, doi: 10.2337/db16-1167.
 26. Govers, R. (2014) Molecular mechanisms of GLUT4 regulation in adipocytes, *Diabetes Metab.*, **40**, 400-410, doi: 10.1016/J.DIABET.2014.01.005.
 27. Beaven, S. W. W., Matveyenko, A., Wroblewski, K., Chao, L., Wilpitz, D., et al. (2013) Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance, *Cell Metab.*, **18**, 106-117, doi: 10.1016/j.cmet.2013.04.021.
 28. Herman, M. A., Peroni, O. D., Villoria, J., Schön, M. R., Abumrad, N. A., et al. (2012) A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism, *Nature*, **484**, 333-338, doi: 10.1038/nature10986.
 29. Hua, Z. G., Xiong, L. J., Yan, C., Wei, D. H., Ying Pai, Z., et al. (2016) Glucose and insulin stimulate lipogenesis in porcine adipocytes: dissimilar and identical regulation pathway for key transcription factors, *Mol. Cells*, **39**, 797-806, doi: 10.14348/molcells.2016.0144.
 30. Nuotio-Antar, A. M., Pongvarin, N., Li, M., Schupp, M., Mohammad, M., et al. (2015) FABP4-Cre mediated expression of constitutively active ChREBP protects against obesity, fatty liver, and insulin resistance, *Endocrinology*, **156**, 4020-4032, doi: 10.1210/en.2015-1210.
 31. Song, Z., Xiaoli, A. M., and Yang, F. (2018) Regulation and metabolic significance of *de novo* lipogenesis in adipose tissues, *Nutrients*, **10**, 1383, doi: 10.3390/nu10101383.
 32. Tan, Z., Du, J., Shen, L., Liu, C., Ma, J., et al. (2017) MiR-199a-3p affects adipocytes differentiation and fatty acid composition through targeting SCD, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **492**, 82-88, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.030.
 33. De Castro, J.P.W., Blandino-Rosano, M., and Bernal-Mizrachi, E. (2018) The microRNA 199a family is regulated by glucose levels in pancreatic beta cells, *Diabetes*, **67**, 2170, doi: 10.2337/db18-2170-P.
 34. Li, Y. B., Wu, Q., Liu, J., Fan, Y. Z., Yu, K. F., and Cai, Y. (2017) miR-199a-3p is involved in the pathogenesis and progression of diabetic neuropathy through downregulation of SerpinE2, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 2417-2424, doi: 10.3892/mmr.2017.6874.
 35. Flowers, M. T., Ade, L., Strable, M. S., and Ntambi, J. M. (2012) Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity, *J. Lipid Res.*, **53**, 1646-1653, doi: 10.1194/jlr.M027508.
 36. Dragos, S. M., Bergeron, K. F., Desmarais, F., Suito, K., Wright, D. C., et al. (2017) Reduced SCD1 activity alters markers of fatty acid reesterification, glyceroneogenesis, and lipolysis in murine white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **313**, 295-304, doi: 10.1152/ajpcell.00097.2017.
 37. Soriguer, F., Moreno, F., Rojo-Martínez, G., García-Fuentes, E., Tinahones, F., et al. (2003) Monounsaturated n-9 fatty acids and adipocyte lipolysis in rats, *Br. J. Nutr.*, **90**, 1015-1022, doi: 10.1079/BJN2003993.
 38. Cruz, M. M., Lopes, A. B., Crisma, A. R., De Sá, R. C. C., Kuwabara, W. M. T., et al. (2018) Palmitoleic acid (16 : 1 n7) increases oxygen consumption, fatty acid oxidation and ATP content in white adipocytes, *Lipids Heal. Dis.*, **17**, 55, doi: 10.1186/s12944-018-0710-z.
 39. Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendziorski, C. M., et al. (2002) Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11482-11486, doi: 10.1073/pnas.132384699.
 40. Tripathy, S., Torres-Gonzalez, M., and Jump, D. B. (2010) Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity corrects dietary fat-induced hyperglycemia in obese BL/6J mice, *J. Lipid Res.*, **51**, 2642-2654, doi: 10.1194/jlr.M006080.
 41. Steffensen, K. R., and Gustafsson, J. A. (2004) Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR), *Diabetes*, **53**, Suppl. 1, 36-42, doi: 10.2337/diabetes.53.2007.s36.
 42. Drag, J., Goździalska, A., Knapik-Czajka, M., Gawędzka, A., Gawlik, K., and Jaśkiewicz, J. (2017) Effect of high carbohydrate diet on elongase and desaturase activity and accompanying gene expression in rat's liver, *Genes Nutr.*, **12**, 2, doi: 10.1186/s12263-017-0551-9.
 43. Kanazawa, M., Xue, C. Y., Kageyama, H., Suzuki, E., Ito, R., et al. (2003) Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance, *Nutr. Rev.*, **61**, 27-33, doi: 10.1301/nr.2003.may.s27-s33.
 44. Xue, C. Y., Kageyama, H., Kashiba, M., Kobayashi, A., Osaka, T., et al. (2001) Different origin of hypertriglyceridemia induced by a high-fat and a high-sucrose diet in ventromedial hypothalamic-lesioned obese and normal rats, *Int. J. Obes.*, **25**, 434-438, doi: 10.1038/sj.ijo.0801548.
 45. Huang, W., Dedouis, N., and O'Doherty, R. M. (2007) Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion, *J. Appl. Physiol.*, **102**, 2260-2265, doi: 10.1152/jappphysiol.01449.2006.
 46. Feng, R., Du, S., Chen, Y., Zheng, S., Zhang, W., et al. (2015) High carbohydrate intake from starchy foods is positively associated with metabolic disorders: a Cohort Study from a Chinese population, *Sci. Rep.*, **5**, 16919, doi: 10.1038/srep16919.

IMPACT OF HIGH-SUCROSE DIET ON THE mRNA LEVELS FOR ELONGASES AND DESATURASES AND ESTIMATED PROTEIN ACTIVITY IN RAT ADIPOSE TISSUE

Jagoda Drag^{1*}, Malgorzata Knapik-Czajka¹, Anna Gawedzka¹,
Joanna Gdula-Argasinska², and Jerzy Jaskiewicz¹

¹ Department of Biochemical Analytics, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland; E-mail: jagoda.drag@uj.edu.pl

² Department of Radioligands, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Krakow, Poland

Fatty acids (FAs) present in the adipose tissue (AT) can be modified by elongases and desaturases. These enzymes are regulated by different factors including nutrients. The aim of the study was to evaluate the impact of high-sucrose diet (HSD; 68% sucrose) on the levels of mRNAs for elongases (*Elovl2*, *Elovl5*, *Elovl6*) and desaturases (*Fads1*, *Fads2*, *Scd*) and on the activity of the corresponding proteins in the rat AT. Male Wistar rats were randomized into two study groups: fed with an HSD and with a standard diet (ST). The mRNA levels were determined by a semi-quantitative reverse transcription-PCR. FA composition was analyzed by gas chromatography, and FA ratios were used to estimate the activity of the enzymes. In the HSD rats, the levels of *Elovl5*, *Elovl6*, *Fads1*, and *Scd* mRNAs were higher, while the level of *Fads2* mRNA was lower than in the ST group. Higher levels of *Elovl5* and *Elovl6* mRNAs corresponded to higher relative activities of these enzymes, while downregulation of the *Fads2* mRNA was associated with the lower activity of this desaturase. In contrast, an increase in the level of *Scd* mRNA was accompanied by a decrease in the enzyme activity. Less monounsaturated FAs was detected in the AT of HSD rats than in the ST group. The composition of individual FAs differed between the groups. This study supports the notion that the regulation of mRNA levels and activity of both elongases and desaturases play an important role in managing the AT lipid composition in response to changes in the dietary status.

Keywords: elongases, desaturases, fatty acids, high-sucrose diet, adipose tissue