

LICHÉ MASTNÉ KYSELINY U DIABETIKŮ TYPU 2

Radim Janeček, Martina Špryncová a Alexander Čegan

Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

Abstract

This work deals with the study of lipid metabolism in type 2 diabetics focusing on changes in odd numbered fatty acid concentrations. Diabetes mellitus is a syndrome of metabolic disorders in which insulin concentrations and secretion is impaired. It shows off as impaired metabolism of glucose, lipids and proteins. The main goal of this work was to measure concentrations of odd numbered fatty acids (ONFA) in healthy individuals and in patients with type 2 diabetes mellitus and to compare those concentrations between both groups with the use of statistical methods. Plasma samples were deproteinized and lipids were extracted into organic solvents. Thin layer chromatography was used to separate 5 lipid fractions. All lipid fractions were derivatized into fatty acid methyl esters and analyzed by a gas chromatograph. ONFA are minor group of fatty acids and their concentrations are lower in type 2 diabetes mellitus. The most significant changes in concentrations were observed at tridecanoic and pentadecanoic acid.

Souhrn

Tato práce se zabývá lipidovým metabolismem u diabetiků typu 2 se zaměřením na změny koncentrací lichých mastných kyselin. Diabetes mellitus je syndromem metabolických poruch, u kterých dochází k poruše inzulínové sekrece a změně koncentrace inzulínu v krvi. Tato porucha se projevuje porušeným metabolismem glukózy, lipidů a bílkovin. Hlavním cílem práce bylo změřit koncentrace lichých mastných kyselin (LMK) u zdravých jedinců a u pacientů s diagnózou diabetes mellitus typu 2 a porovnat tyto koncentrace mezi oběma skupinami s použitím statistických metod. Vzorky plasmy byly deproteinovány a lipidy byly extrahovány do organického rozpouštědla. Tenkovrstvá chromatografie byla použita k rozdělení pěti lipidových frakcí. Všechny lipidové frakce byly derivatizovány na methyl estery a analyzovány pomocí plynového chromatografu. LMK jsou minoritní skupinou mastných kyselin a jejich koncentrace u diabetiků typu 2 jsou sniženy. Nejpatrnější změny v koncentracích byly pozorovány u tridekanové a pentadekanové kyseliny.

1. Úvod

Diabetes mellitus (DM) je skupina metabolických onemocnění charakterizovaných hyperglykemií, která vznikla z narušení inzulínové sekrece, inzulínové akce, nebo jejich kombinací. Chronická hyperglykémie u diabetiků je spojena s dlouhodobým poškozením, dysfunkcí a selháním mnoha orgánů, zejména očí, ledvin, nervů, srdce a cév [1]. DM typu 2 je způsoben kombinací inzulínové rezistence a porušenou sekrecí inzulínu. Jedná se o formu diabetu, která zahrnuje 90-95% nemocných s diagnózou DM. Většina pacientů s touto formou DM jsou obézní a obezita sama o sobě způsobuje do jisté míry inzulínovou rezistenci.

Zvýšené procento tělesného tuku uloženého především v abdominální oblasti, dyslipidémie, dyslipoproteinémie a hypertenze se u tohoto typu DM běžně vyskytují. V krvi je zvýšená hladina triacylglycerolů, snížená hladina lipoproteinů o vysoké hustotě - HDL (high density lipoproteins), a malé denzní lipoproteinové částice o nízké hustotě - LDL (low density lipoproteins). Pacienti s DM typu 2 mají zvýšené riziko vzniku aterosklerózy a dalších kardiovaskulárních onemocnění [1, 2]. Inzulínová rezistence s porušeným metabolismem glukózy se vyskytuje jak u jaterních buněk, tak i v periferních tkáních, především ve svalech [3]. Patofyziologie inzulínové rezistence zahrnuje komplex signálních drah, aktivovaných inzulínovým receptorem, které regulují intermediární metabolismus a jeho organizaci v buňce [4]. Zvýšené volné mastné kyseliny se velkou měrou podílejí na vzniku a progresi inzulínové rezistence u obezních pacientů s DM typu 2 [5]. To vede k otázce, které mastné kyseliny způsobují inzulínovou rezistenci a jsou v pozitivní korelaci s tímto typem DM.

LMK jsou minoritní skupinou mastných kyselin vyskytujících se v lidském těle. Nejhojněji se vyskytující LMK jsou kyselina pentadekanová (C15:0) a heptadekanová kyselina (C17:0). V lidském těle nedochází k fyziologické syntéze LMK kromě velmi nízkého množství α -oxidací [6]. LMK a mastné kyseliny s větveným řetězcem mají zvýšený výskyt v mléce, mase, tukové tkáni přežvýkavců a v produktech vyrobených z těchto zdrojů. Konzumace těchto produktů je pro člověka hlavním zdrojem LMK. Výskyt LMK v těle přežvýkavců je především způsoben bachorovými bakteriemi, které LMK produkují ve svém metabolismu a jejich membrány obsahují vysoké procento LMK. β -oxidace LMK v lidském těle končí na propionyl-CoA, který po transformaci na succinyl-CoA vstupuje do citrátového cyklu, kde je odbourán. Existují poruchy enzymů přeměňujících propionyl-CoA a tento stav se nazývá propionová acidémie, kde dochází k akumulaci propionátu v krvi a k acidóze. Propionyl-CoA, hromadící se v metabolismu, „soutěží“ s acetyl-CoA v syntéze mastných kyselin, a tudíž jsou LMK syntetizovány a jejich výskyt v lidském těle se zvyšuje [6-10].

2. Experimentální část

2.1 Reagencie a použité chemikálie

Isopropanol p.a., n-hexan p.a., kyselina octová 99% byly pořízeny z PENTA (Praha, Česká republika). n-heptan p.a., diethyl ether p.a., methanol p.a., toluen p.a. a bezvodý uhličitan draselný byly pořízeny z Lach-Ner s.r.o. (Neratovice, Česká republika). Kyselina fosforečná p.a. byla pořízena z CHEMAPOL (Praha, Česká republika). 2',7'-dichlorofluorescein pro TLC detekci byl pořízen z Carl Roth GmbH (Karlsruhe,

Německo). Acetylchlorid >99% byl pořízen ze Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Interní standard (cis-13,16,19 docosatrienová kyselina) byl pořízen z Larodan Fine Chemicals AB (Malmö, Švédsko).

2.2 Vzorky

Bylo zpracováno a změřeno 21 anonymních vzorků plasmy obdržených od pacientů s diagnózou DM typu 2 a 17 vzorků plasmy zdravých jedinců použitých jako kontrola.

2.3 Příprava vzorku

Všechny vzorky plasmy ve skleněných zkumavkách byly deproteinovány roztokem isopropanolu, n-heptanu a 2M H_3PO_4 (40:20:1), řádně zamíchány a nechány kondicionovat po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Potom byly všechny lipidy extrahovány do organického rozpouštědla přidáním roztoku toluen:methanol (4:1) a vody. Následovala centrifugace a organická vrstva byla převedena do čisté skleněné zkumavky a odpařena pod dusíkem.

2.4 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a převeden na TLC desku. Deska byla vložena do chromatografické vany nasycené parami mobilní fáze (160 ml n-hexanu, 40 ml diethyl etheru a 6 ml kyseliny octové) a ponechána vzlínat po dobu okolo jedné hodiny, dokud mobilní fáze nedosáhla čela. Vizualizace frakcí lipidů byla provedena aplikací 2',7'-dichlorofluoresceinu na dráhu TLC standardu (pool plasma) a pět frakcí bylo označeno, extrahováno z desky a přesunuto do pyrexové zkumavky s víčkem obsahujícím teflonové těsnění. K pěti frakcím (fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly a estery cholesterolu) v pyrexových zkumavkách byl přidán interní standard (cis-13,16,19 docosatrienová kyselina) o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, který byl rozpuštěn v toluenu s methanolem (4:1).

2.5 Derivatizace

Všechny frakce byly derivatizovány na estery mastných kyselin přidáním acetylchloridu a směs byla ponechána reagovat po dobu 1 hodiny v termobloku vyhřátém na 100 °C. Po derivatizaci byly pyrexové zkumavky ponechány vychladnout při laboratorní teplotě v digestoři. 6% roztok uhličitanu draselného byl použit k neutralizaci obsahu zkumavek. Následovala centrifugace a po ní organická vrstva byla převedena do čisté

skleněné zkumavky a odpařena pod dusíkem. Odparek byl rozpuštěn v toluenu a přemístěn do chromatografické vialky s insertem a vialky byly následně zavičkovány.

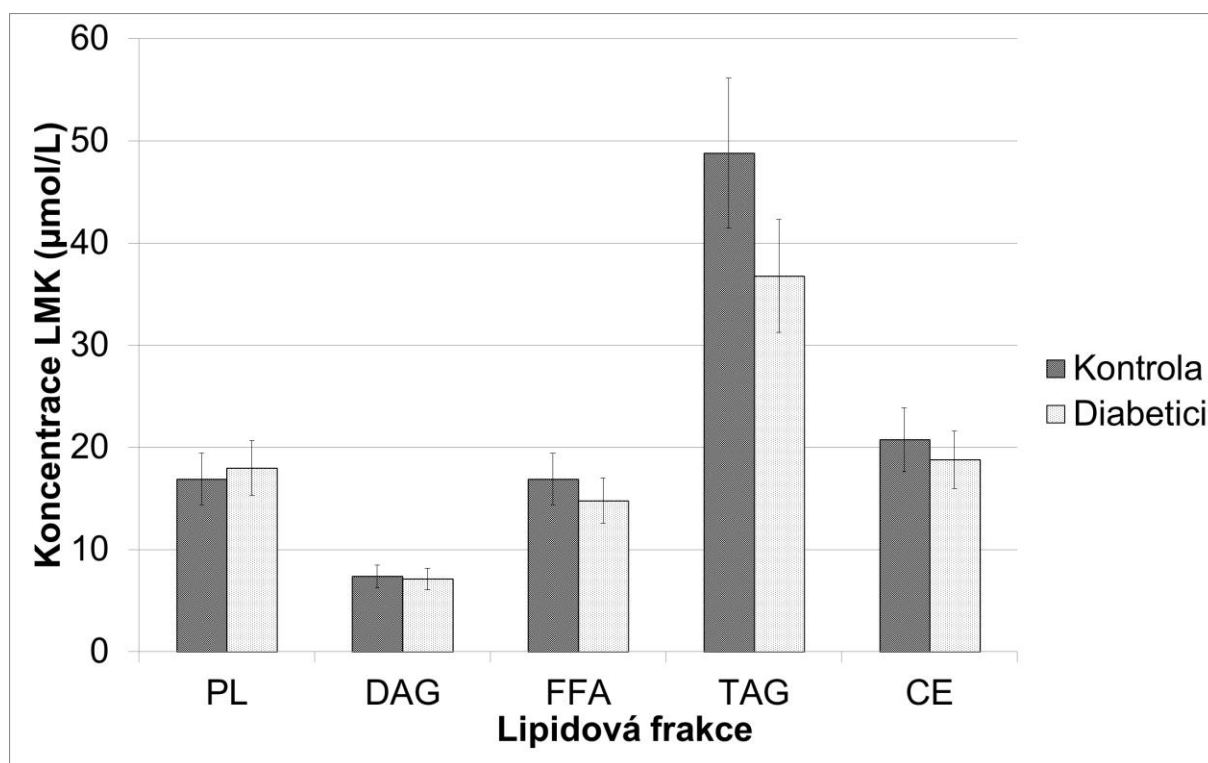
2.6 Plynová chromatografie

Vzorky v chromatografických vialkách byly změřeny plynovým chromatografem Agilent Technologies 7890A s autosamplermem a plamenově-ionizačním detektorem. Při analýze byla použita kolona HP-88 (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm), která je speciálně navržena pro separaci esterů mastných kyselin. Chromatogramy byly integrovány v programu GC ChemStation B.04.03 a získaná data byla zpracována v Microsoft Excel 2010 a Statistica 12 s použitím t-testu a hladina významnosti p menší než 0,05 byla považována za statisticky významnou.

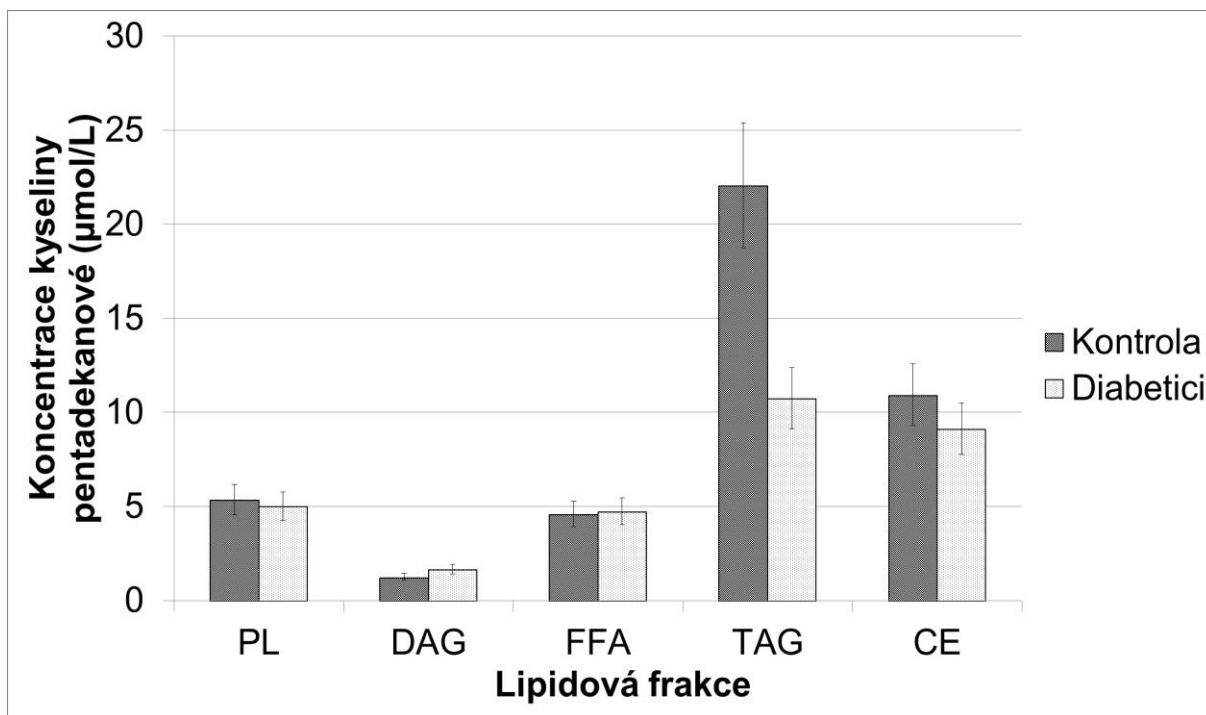
3. Výsledky a diskuze

V této práci bylo změřeno 41 mastných kyselin, ze kterých bylo 8 LMK. Měřené LMK byly undekanová kyselina (C11:0), tridekanová kyselina (C13:0), pentadekanová kyselina (C15:0) a její izoformy 12-methylmyristová kyselina (12M-C14:0; anteiso C15:0) a 13-methylmyristová kyselina (13M-C14:0, iso C15:0), heptadekanová kyselina (C17:0) a její izoforma 14-methylhexadekanová kyselina (14M-C16:0, anteiso C17:0) a nonadekanová kyselina (C19:0). Bylo změřeno 38 vzorků, ze kterých 17 patřilo zdravým dárčům použitých jako kontrola a 21 patřilo pacientům s diagnózou DM typu 2. Každý vzorek byl rozdělen na frakce: fosfolipidy (PL), diacylglyceroly (DAG), volné mastné kyseliny (FFA), triacylglyceroly (TAG) a estery cholesterolu (CE). Jak bylo očekáváno, LMK s nejvyššími hodnotami byly C15:0 a C17:0. Důvod těchto hodnot může být podobnost v délce řetězce, která je blízko kyselině palmitové (C16:0) a kyselině stearové (C18:0), které jsou nejhojněji zastoupenými nasycenými mastnými kyselinami, a de novo syntéza mastných kyselin končí na kyselině palmitové. LMK jsou minoritní skupinou mastných kyselin a jejich koncentrace v kontrolní skupině byla 1,1 % a 0,96 % u diabetiků. V dřívějších studiích bylo popsáno nižší riziko vzniku DM typu 2 s vyššími hodnotami LMK [6, 11, 12]. Toto zjištění bylo pozorováno i v naší práci (Obr. 1), kde diabetici mají nižší koncentrace LMK v dominantních frakcích FFA, TAG a CE a tudíž zvýšené riziko vzniku DM typu 2. Největší změny byly pozorovány u koncentrací C15:0 (Obr. 2). C15:0 je lehce zvýšená ve frakcích DAG a FFA u diabetiků. Tyto frakce nejvíce souvisí s lipidy a mastnými kyselinami přijatými v potravě a jsou zpracovány v játrech. Frakce TAG, PL a CE vznikají primárně v játrech a v těchto frakcích C15:0 má nižší koncentrace u diabetiků ve srovnání s kontrolou. Ve frakci

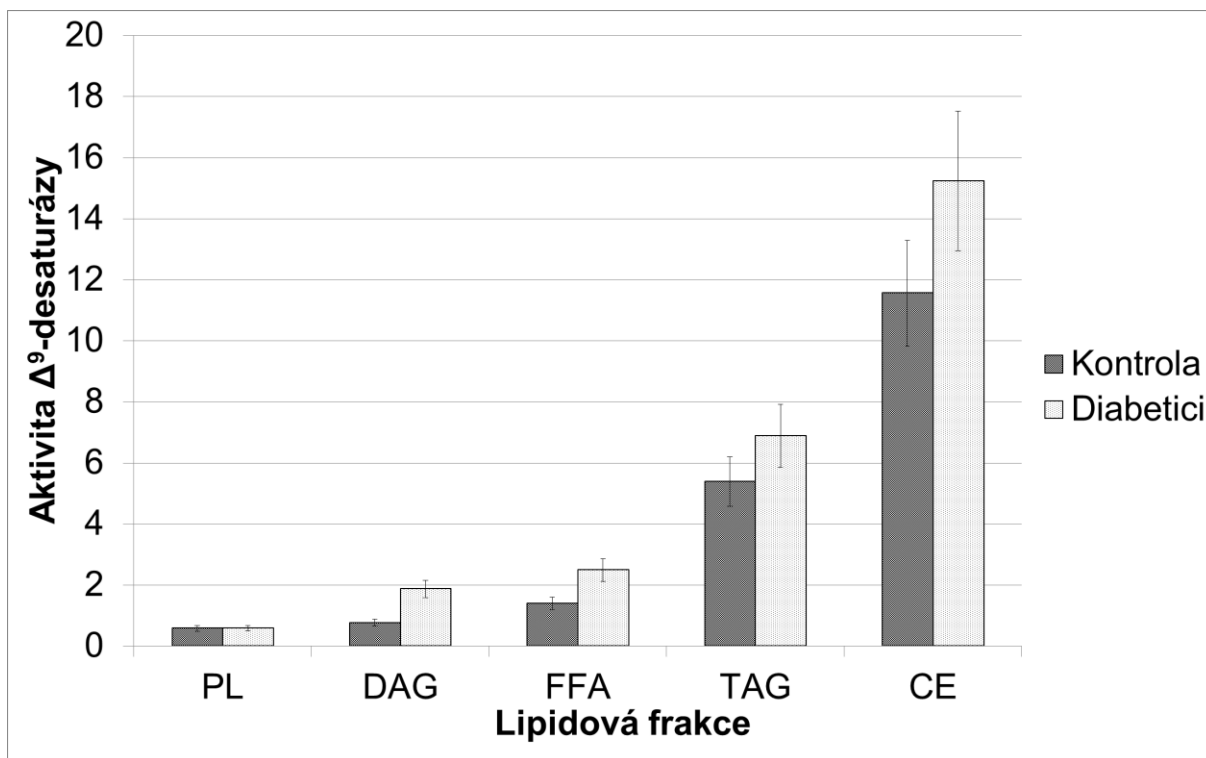
TAG je největší rozdíl. Na základě tohoto zjištění jsme navrhli hypotézu, že C15:0 je metabolizována v játrech. Pro podporu naší hypotézy byly změřeny aktivity jaterních enzymů Δ^9 -desaturázy (Obr. 3) a elongázy (Obr. 4). Δ^9 -desaturáza vytváří dvojnou vazbu mezi devátým a desátým uhlíkem mastné kyseliny od karboxylového konce a elongáza prodlužuje řetězec mastné kyseliny o dva uhlíky. Aktivity těchto enzymů jsou spočítány jako poměr produkt/substrát, a proto tyto aktivity jsou bez jednotky. Aktivita Δ^9 -desaturázy je významně zvýšená ve všech lipidových frakcích kromě frakce PL. Na druhé straně aktivita elongázy je snižena ve všech lipidových frakcích kromě frakce PL. Toto zjištění potvrzuje pravděpodobné odbourávání C15:0 Δ^9 -desaturázou nikoliv však elongázou. Další LMK s významnými změnami ve všech lipidových frakcích je C13:0 (Obr. 5). Tato mastná kyselina je pozitivně korelována s DM typu 2 a má zvýšené koncentrace ve všech lipidových frakcích navzdory tomu, že většina LMK je negativně spojena s DM typu 2. C13:0 a C15:0 by mohly být použity jako markery DM typu 2. Zbývající LMK mají nižší nebo žádný vztah k DM typu 2.



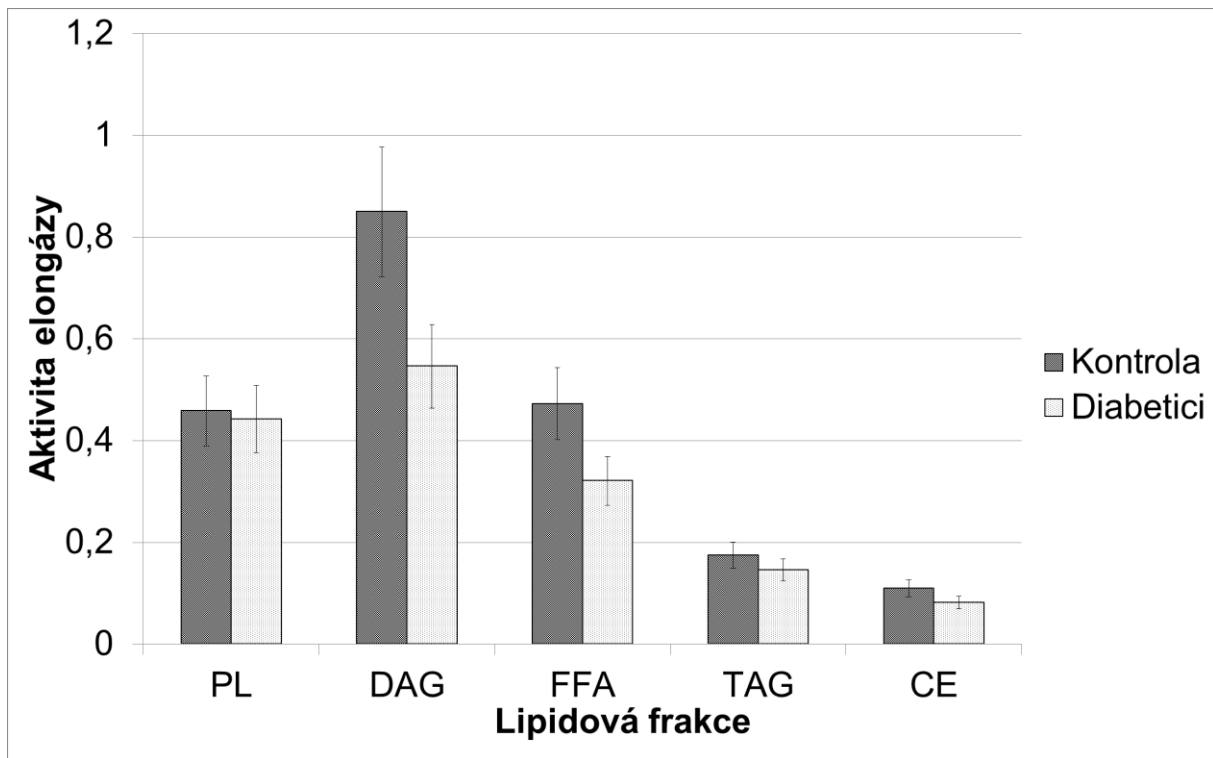
Obrázek 1 Koncentrace LMK ve všech frakcích u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



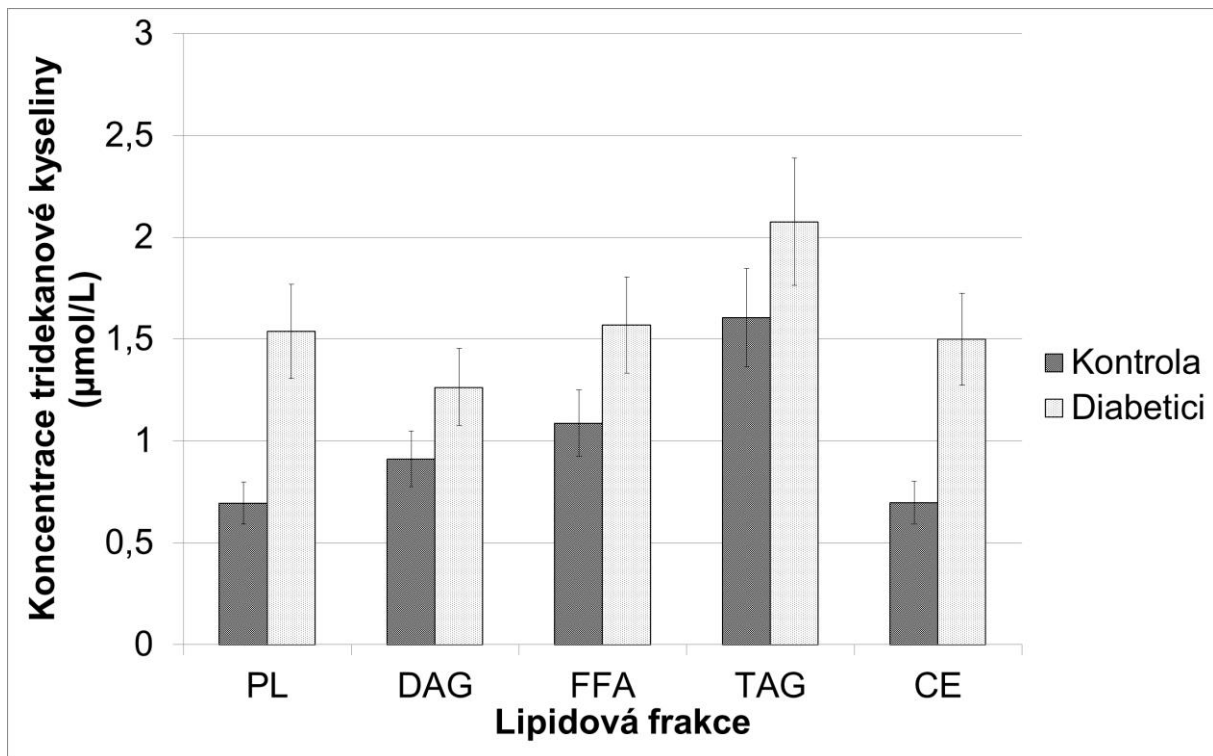
Obrázek 2 Koncentrace kyseliny pentadekanové ve všech frakcích u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



Obrázek 3 Aktivita Δ^9 -desaturázy ve všech frakcích u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



Obrázek 4 Aktivita elongázy ve všech frakcích u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



Obrázek 5 Koncentrace kyseliny tridekanové ve všech frakcích u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2

4. Závěr

V současnosti počet nemocných s DM typu 2 roste. Abychom se vyhnuli komplikacím spojených s hyperglykemií a DM typu 2, potřebujeme diagnostické postupy pro dřívější diagnózu DM. Díky porušenému lipidovému metabolismu u DM typu 2 se tato práce zabývá monitorováním koncentrací mastných kyselin u diabetiků (21 vzorků) a porovnává tyto koncentrace s kontrolní skupinou (17 vzorků). V této práci byly sledovány koncentrace LMK. Byly nalezeny změny v koncentracích mezi oběma skupinami. LMK mají nižší koncentrace u DM typu 2 kromě tridekanové kyseliny. Tato kyselina má značně vyšší koncentrace ve všech lipidových frakcích u diabetiků, a tudíž může být použita jako marker pro diagnózu DM typu 2. Koncentrace kyseliny pentadekanové se mění mezi FFA, DAG a TAG, CE. Tento jev je pravděpodobně způsoben desaturací kyseliny pentadekanové v játrech.

Literatura

1. American Diabetes Association: *Diabetes Care* **29** (2006), S43-S48.
2. The ACCORD Study Group: *N. Engl. J. Med.* **362** (2010), 1563-1574.
3. Groop L. C., Bonadonna R. C., DelPrato S., Ratheiser K., Zyck K., Ferrannini E., DeFronzo R. A.: *J. Clin. Invest.* **84** (1989), 205-213.
4. Saltiel A. R., Kahn C. R.: *Nature* **414** (2011), 799-806.
5. Boden G.: *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **18** (2011), 139-143.
6. Jenkins B., West J. A., Koulman A.: *Molecules* **20** (2015), 2425-2444.
7. Brevik a., Veierød M. B., Drevon C. A., Andersen L. F.: *European Journal of Clinical Nutrition* **59** (2005), 1417-1422.
8. Vlaeminck B., Fievez V., Cabrita A. R. J., Fonseca A. J. M., Dewhurst R. J.: *Animal Feed Science and Technology* **131** (2006), 389-417.
9. Horning M. G., Martin D. B., Karmen A., Vagelos P. R.: *J. Biol. Chem.* **236** (1961), 669-672.
10. Sperl W., Murr C., Skladal D., Sass J. O., Suormala T., Baumgartner R., Wendel U.: *Eur. J. Pediatr.* **159** (2000), 54-58.
11. Krachler B., Norberg M., Eriksson J. W., Hallmans G., Johansson I., Vessby B., Weinehall L., Lindahl B.: *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **18** (2008), 503-510.
12. Dawczynski C., Kleber M. E., März W., Jahreis G., Lorkowski S.: *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **25** (2015), 1071-1078.