

INZULÍNOVÁ REZISTENCE

Radim Janeček, Pavla Fialová a Alexander Čegan

Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita

Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice

E-mail radim.janecek1@student.upce.cz

Souhrn

Inzulínová rezistence je stav, kdy už naše tělo není schopné optimálně hospodařit se základními živinami. Inzulín ztrácí svojí účinnost, dochází k hyperglykémii a je narušen i lipidový metabolismus. U získané inzulínové rezistence je vše způsobeno obezitou, jejíž prevalence celosvětově roste. Inzulínová rezistence předchází onemocněním diabetes mellitus typu 2 a dalším komplikacím spojeným jak s diabetem, tak s obezitou. Cílem této práce bylo sledovat koncentrace mononenasycených mastných kyselin a najít závislosti k inzulínové rezistenci a onemocněním diabetes mellitus typu 2. Zanalyzováno bylo 21 vzorků plazmy diabetiků a 17 vzorků plazmy zdravých dárců. Po extrakci lipidů z plazmy byly lipidy rozděleny pomocí tenkovrstvé chromatografie do jednotlivých tříd, derivatizovány a metylestery mastných kyselin byly změřeny pomocí plynového chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Největší změny byly pozorovány u kyseliny stearové, olejové, trans-vakcenové a nervonové.

Abstract

Insulin resistance is a condition where our body is unable to optimally manage the essential nutrients. Insulin loses its efficiency, it leads to hyperglycemia and lipid metabolism is impaired. In acquired insulin resistance is all caused by obesity. The prevalence of obesity is increasing worldwide nowadays. The insulin resistance precedes diabetes mellitus type 2 and other complications associated with both diabetes and obesity. The aim of this work was to measure concentrations of monounsaturated fatty acids and to find out dependencies with insulin resistance and diabetes mellitus type 2. There were analyzed 21 samples of type 2 diabetics plasma and 17 samples of healthy donors plasma. After lipid extraction from plasma, the lipids were separated by thin layer chromatography into individual classes, derivatized and methyl esters of fatty acids were analyzed by gas chromatograph with flame-ionization detector. The largest changes were observed for stearic, oleic, trans-vaccenic and nervonic acid.

1. Úvod

Vztah obezity, inzulínové rezistence (IR) a chronických mikrozánětů je známý již po mnoho let a tyto faktory se vzájemně ovlivňují. Bylo objasněno mnoho mechanismů na buněčné a molekulární úrovni, které prostřednictvím zánětu snižují inzulínovou senzitivitu u obézních pacientů. Přesto patogeneze inzulínové rezistence způsobená obezitou je stále v mnoha ohledech nejasná [1]. Inzulín je peptidický hormon, který hraje základní roli v energetickém metabolismu. Má anabolické účinky a účastní se metabolismu sacharidů, tuků

i proteinů. Koordinuje skladování a využití živin v tukové tkáni, játrech a kosterním svalstvu. Jako jediný hormon snižuje hladinu glukózy v krvi tím, že usnadňuje její vstup do buněk a její ukládání ve formě glykogenu [2, 3, 4]. Vznik inzulínové rezistence předchází vzniku diabetes mellitus typu 2 (DMT2) a vyvíjí se postupně. Inzulínová rezistence je stav, při kterém je fyziologická koncentrace inzulínu v krevním oběhu nedostatečná k vyvolání adekvátní biologické odpovědi. Ze začátku je tato skutečnost kompenzovaná vyšší sekrecí inzulínu. Po nějaké době stav dospěje i ke snížené sekreci inzulínu v β -buňkách pankreatu a začne se rozvíjet diabetes mellitus typu 2 [1, 3].

Snížená citlivost tkání k inzulínu se začne projevovat hyperglykemií. Jednak v játrech není potlačena novotvorba glukózy - glukoneogeneze a zároveň vstup glukózy do buněk je snížený, takže buňky jsou schopny vylučovat menší množství glukózy z krve. S progresí inzulínové rezistence dochází kromě vzniku DMT2 i k abnormalitám v krevním srážení a fibrinolýze, hypertenzi, dyslipidémii, ateroskleróze nebo jaterní steatóze. Souhrnně se většina těchto poruch označuje jako metabolický syndrom [5]. Příčiny vzniku IR mohou být vrozené nebo získané, přičemž získané převažují [6]. Nejčastější příčinou IR je obezita s nedostatkem fyzické aktivity, stresem, nevhodným složením potravy a přejídáním. Rovněž ektopické ukládání lipidů a kumulace viscerální tukové tkáně přímo souvisí s rozvojem IR [2,6,7,8].

Volné mastné kyseliny (VMK) uvolněné z nadbytečné tukové tkáně jsou zvýšeny v mnoha inzulín-rezistentních stavech, a pokud jejich zvýšená koncentrace přetrvává několik hodin, dochází ke vzniku IR [9]. Po vzniku inzulínové rezistence není inzulín schopen inhibovat hormon senzitivní lipázu v tukové tkáni, která lipolýzou triacylglycerolů uvolňuje nadbytek volných mastných kyselin do krevního oběhu. Tato zvýšená koncentrace VMK vede právě k ektopickému ukládání tuků do míst jako jsou svaly, játra, pankreas, cévní stěna a další tkáně. Úpravou životního stylu včetně snížení tělesné hmotnosti lze docílit zlepšení citlivosti na inzulín a snížení rizik plynoucích z IR a DMT2 [1, 10].

Byly nalezeny souvislosti mezi skupinami mastných kyselin a inzulínovou rezistencí. U nasycených mastných kyselin a mastných kyselin s trans dvojnou vazbou byla nalezena pozitivní souvislost s rozvojem inzulínové rezistence. Naproti tomu byly zaznamenány potenciálně ochranné účinky mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin [10, 11, 12, 13, 14].

Cílem této práce bylo nalézt souvislost mezi zástupci mononenasycených mastných kyselin a inzulínovou rezistencí respektive DMT2.

2. Experimentální část

2.1. Použité chemikálie a roztoky

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 uhličitán 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 dokosatrienová kyselina) byl pořízen z Larodan Fine Chemicals AB (Malmö, Švédsko).

Extrakční činidlo: toluen:metanol (4:1); deproteinační činidlo: isopropanol:n-heptan:2M H_3PO_4 (40:20:1); mobilní fáze pro TLC: 160 ml hexan, 40 ml diethyl ether, 6 ml kyselina octová; detekční činidlo pro TLC: 2',7' dichlorofluorescein rozpuštěný v isopropanolu.

2.2. Přístrojové vybavení

Chromatograf Agilent Technologies 7890A s autosamplerem, plamenově-ionizačním detektorem a instalovanou kolonou HP-88 (100 m \times 0.25 mm \times 0.2 μm).

2.3. Vzorky

V této práci bylo zpracováno a změřeno 21 vzorků plazmy pacientů s diagnózou diabetes mellitus typu 2 a 17 vzorků plazmy zdravých dárců použitých jako kontrolní skupina.

2.4. Příprava vzorku

Ze všech vzorků plazmy umístěných ve skleněných zkumavkách byly odstraněny proteiny použitím deproteinačního činidla. Po promíchání na vortexu byly nechány vzorky kondicionovat 10 minut při pokojové teplotě. Následovala extrakce lipidů do extrakčního činidla. Pomocí centrifugy byly vzorky rozděleny na vrchní organickou fázi a dolní vodnou fázi s vysráženými proteiny. Horní organická vrstva byla odebrána do nové zkumavky a odpařena pod dusíkem do sucha.

2.5. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a převeden na startovací linii předem rozvržené TLC desky. TLC deska byla vložena do chromatografické vany předem nasycené parami mobilní fáze. Mobilní fáze postupně vzlínala po dobu zhruba jedné hodiny, než dosáhla vyznačeného čela. Na pole standardu (pool plazma) bylo aplikováno detekční činidlo pro TLC a rozdělených 5 frakcí (fosfolipidy, diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, triacylglyceroly, estery cholesterolu) bylo označeno a přesunuto z desky do pyrexových zkumavek s uzávěrem

s teflonovým těsněním. K těmto lipidovým frakcím byl přidán interní standard o koncentraci 10 µg/ml.

2.6. Derivatizace

Mastné kyseliny ve všech frakcích byly derivatizovány na metylestery použitím derivatizačního činidla acetylchloridu. Derivatizace probíhala při 100 °C za stálého míchání v termobloku po dobu jedné hodiny. Po derivatizaci byly zkumavky ponechány vychladnout v digestoři na pokojovou teplotu. Obsah zkumavek byl zneutralizován 6% roztokem uhličitanu draselného. Po centrifugaci byla horní vrstva přepipetována do čisté zkumavky, odpařena pod dusíkem do sucha a znovu rozpuštěna v toluenu. Vzorek byl převeden do vialky s insertem a zavíčkovan.

2.7. Plynová chromatografie a vyhodnocení

Vzorky v chromatografických vialkách byly umístěny do autosampleru plynového chromatografu a zanalyzovány. Získané chromatogramy byly integrovány v programu GC ChemStation B.04.03 a získaná data byla zpracována v Microsoft Office Excel 2010 a Statistica 12 s použitím Studentova t-testu a hladina významnosti p menší než 0,05 byla považována za statisticky významnou.

3. Výsledky a diskuze

V rámci této práce bylo odečteno a vyhodnoceno 41 mastných kyselin, ze kterých 6 patří do skupiny MUFA. Bylo zkoumáno procentuální zastoupení vybraných mastných kyselin z frakcí volných mastných kyselin (VMK), triacylglycerolů (TAG) a esterů cholesterolu (ECH). Měřené MUFA byly kyselina sapienová (C16:1n10 cis), kyselina palmitoolejová (C16:1n9 cis), kyselina trans-vakcenová (C18:1n7 trans), kyselina olejová (C18:1n9 cis), kyselina vakcenová (C18:1n7 cis) a kyselina nervonová (C24:1n9 cis). Celkem bylo změřeno 38 vzorků plazmy, z čehož 17 vzorků patřilo do skupiny kontrol a 21 vzorků do skupiny diabetiků. Pro každou mastnou kyselinu byly sledovány rozdíly jejího obsahu mezi zdravými dárci a diabetiky (Tabulka 1).

Tabulka 1 Zastoupení statisticky významných mastných kyselin a výsledek Studentova t-testu

Mastná kyselina	Frakce	Kontrola M (%)	Diabetici M (%)	p
<i>C18:0</i>	TAG	5,84	4,89	0,012
	VMK	15,49	10,65	0,000
	ECH	1,63	1,27	0,005
<i>C18:1n7 trans</i>	TAG	0,38	0,27	0,138
	VMK	0,63	0,74	0,075
	ECH	0,03	0,06	0,002
<i>C18:1n9</i>	TAG	31,46	32,25	0,122
	VMK	21,79	25,82	0,041
	ECH	18,84	19,20	0,405
<i>C18:1n7 cis</i>	TAG	1,66	2,19	0,018
	VMK	1,21	1,39	0,776
	ECH	1,02	1,27	0,008
<i>C24:1n9</i>	TAG	0,12	0,08	0,201
	VMK	0,44	0,17	0,044
	ECH	0,14	0,18	0,958

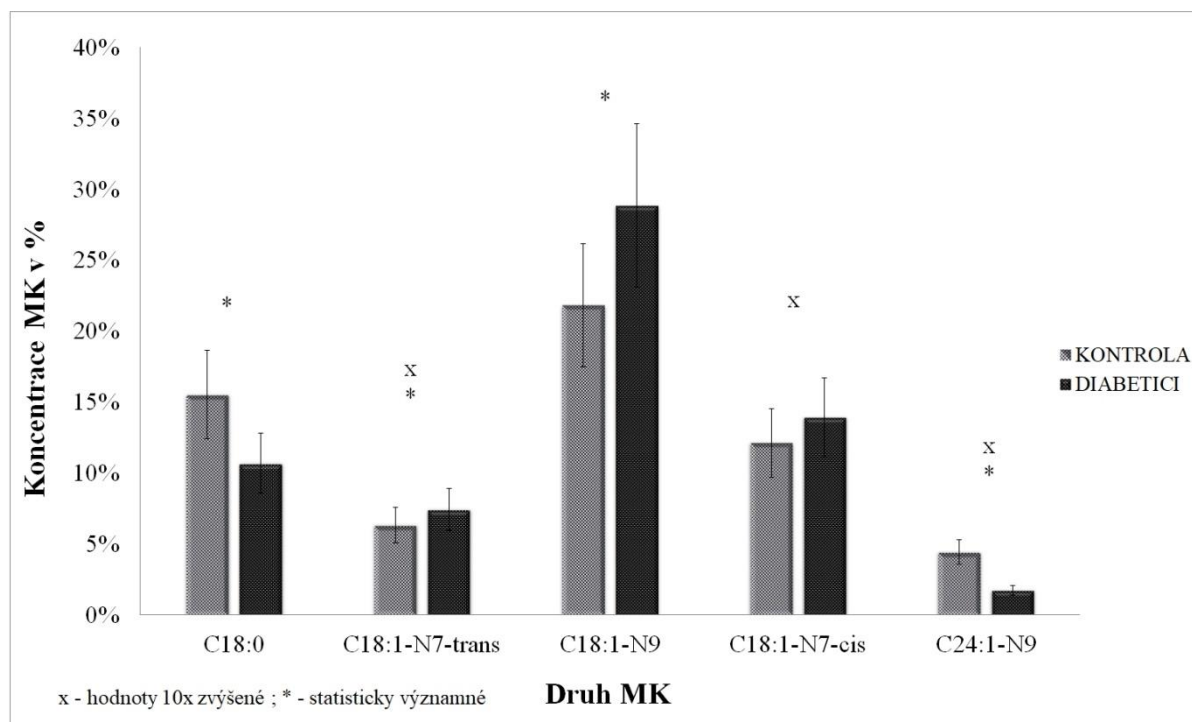
TAG - triacylglyceroly, VMK - volné mastné kyseliny, ECH - estery cholesterolu, M - medián, p - koeficient významnosti

Byl pozorován pokles kyseliny stearové (C18:0) u diabetiků ve všech sledovaných frakcích (Obrázek 1-3). Toto snížení může být způsobeno přeměnou způsobenou enzymem $\Delta 9$ -desaturázou, jehož aktivita je zvýšená ve všech sledovaných frakcích (Obrázek 4). Tento enzym vytváří dvojnou vazbu na devátém uhlíku od karboxylového konce kyseliny stearové za vzniku kyseliny olejové. Aktivita enzymu se počítá jako podíl koncentrace produktu a substrátu, kde u $\Delta 9$ -desaturázy je substrátem kyselina stearová a produktem kyselina olejová. Jelikož se jedná o podíl koncentrací, tak v tomto případě je aktivita enzymu bez jednotky. Byla potvrzena zvýšená koncentrace kyseliny olejové, významná změna byla pozorována ve frakci volných mastných kyselin (Obrázek 1). Rovněž bylo pozorováno zvyšování koncentrace kyseliny olejové v závislosti na glykovaném hemoglobinu u diabetiků (Obrázek 5). Glykovaný hemoglobin (HbA1c) se běžně stanovuje u diabetiků a na základě jeho koncentrace (v % nebo mmol/mol) se sleduje kompenzace diabetu. Nad 5,9% se hodnotí

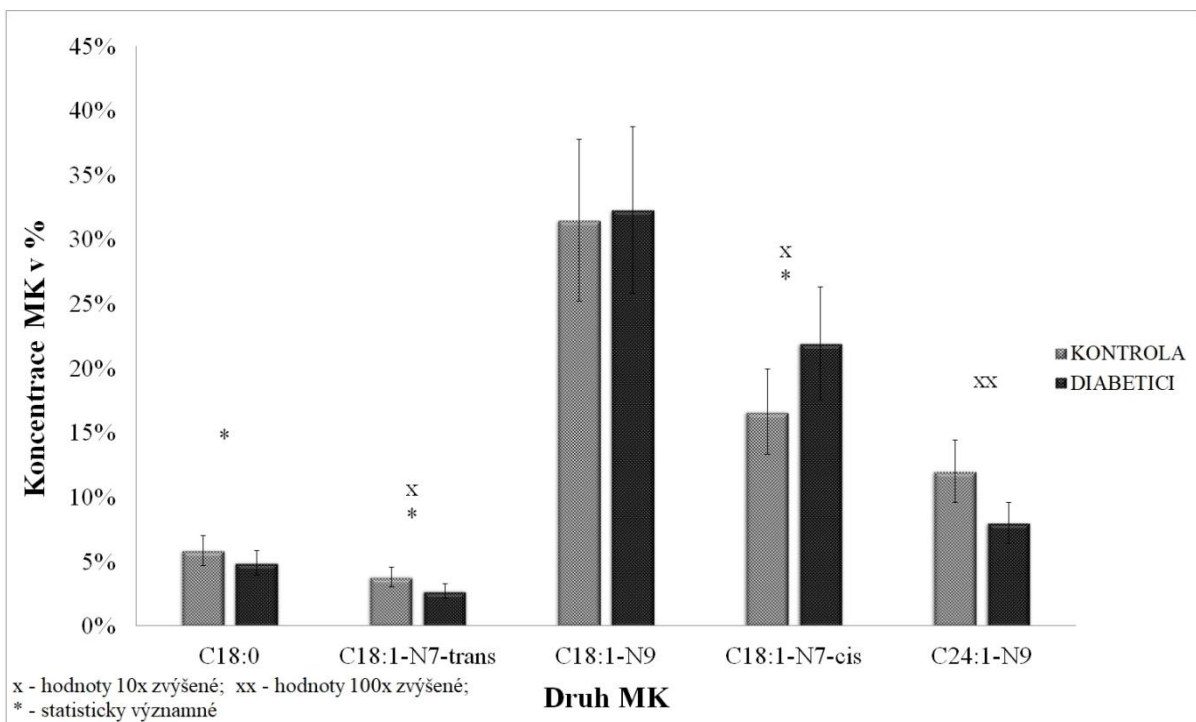
zhoršená kompenzace a se zvyšujícím se zastoupením glykovaného hemoglobinu roste i riziku komplikací diabetu. Vyšší aktivita $\Delta 9$ -desaturázy u diabetiků může být chápána jako snaha organismu chránit se před vyššími koncentracemi nasycených mastných kyselin, které zhoršují senzitivitu inzulínu.

Rovněž byly zaznamenány vyšší koncentrace kyseliny vakcenové, zejména ve frakci triacylglycerolů (Obrázek 2). Byla zjištěna i vyšší koncentrace kyseliny trans-vakcenové ve frakci esterů cholesterolu u diabetiků a potvrzuje tím pozitivní korelaci trans mastné kyseliny a DMT2 (Obrázek 3).

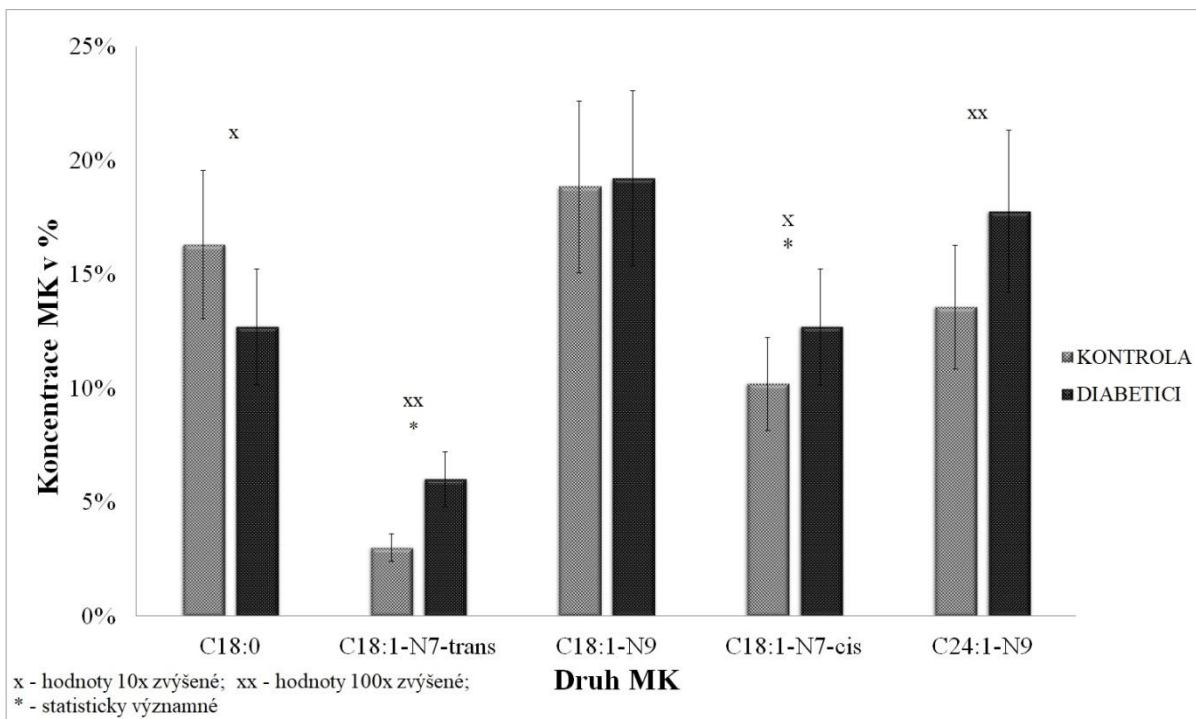
Novým zjištěním je výrazně snížená kyselina nervonová ve frakci VMK u diabetiků (Obrázek 1). Tato kyselina je elongačním produktem kyseliny olejové. Z tohoto důvodu byla vypočítána aktivita elongázy. Elongáza je enzym, který prodlužuje řetězec mastné kyseliny o dva uhlíky. Stejně jako u $\Delta 9$ -desaturázy je jeho aktivita počítána jako podíl produktu a substrátu, v tomto případě je substrátem kyselina palmitová (C16:0) a produktem kyselina stearová (C18:0). Došlo ke zjištění, že aktivita tohoto enzymu je značně snížena u diabetiků, což by mohl být důvod ke snížení kyseliny nervonové v plazmě diabetiků. Kyselina nervonová se nachází především v mozku a periferních nervech, kde se podílí na tvorbě myelinu. Negativně koreluje s koronárními rizikovými faktory a může mít preventivní účinky na metabolické komplikace způsobené obezitou [15]. Kyselina nervonová by mohla být diagnostickým markerem DMT2.



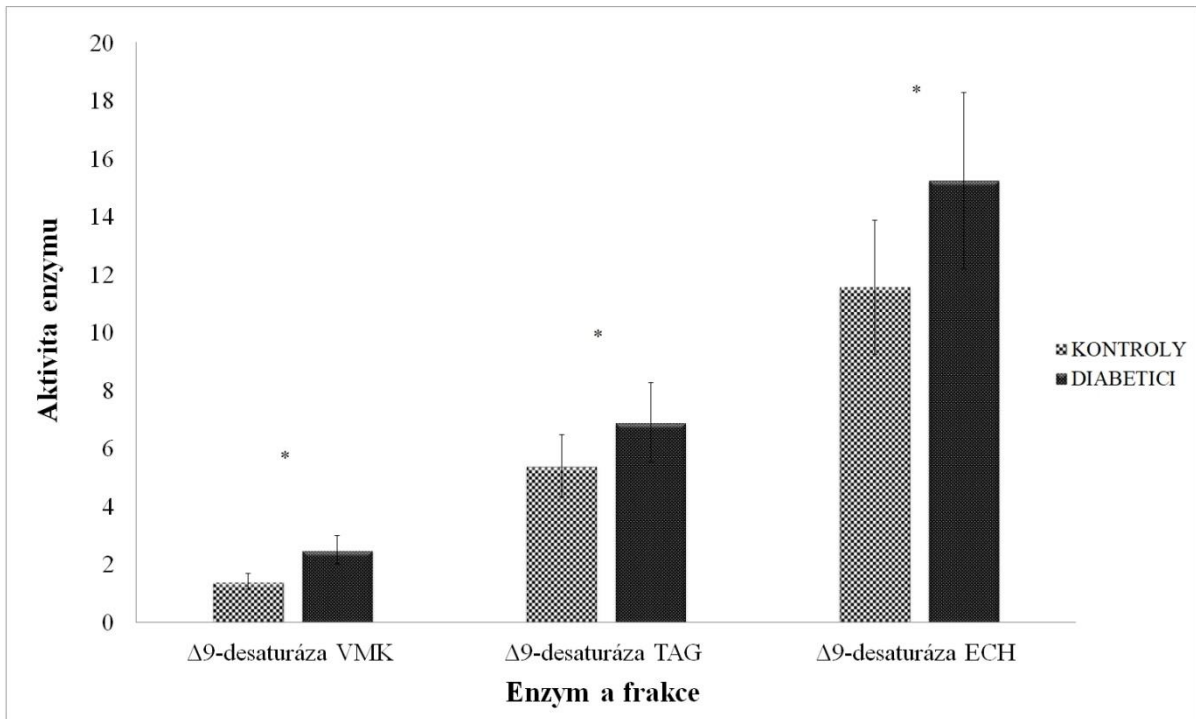
Obrázek 1 Porovnání koncentrace mastných kyselin ve frakci VMK u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



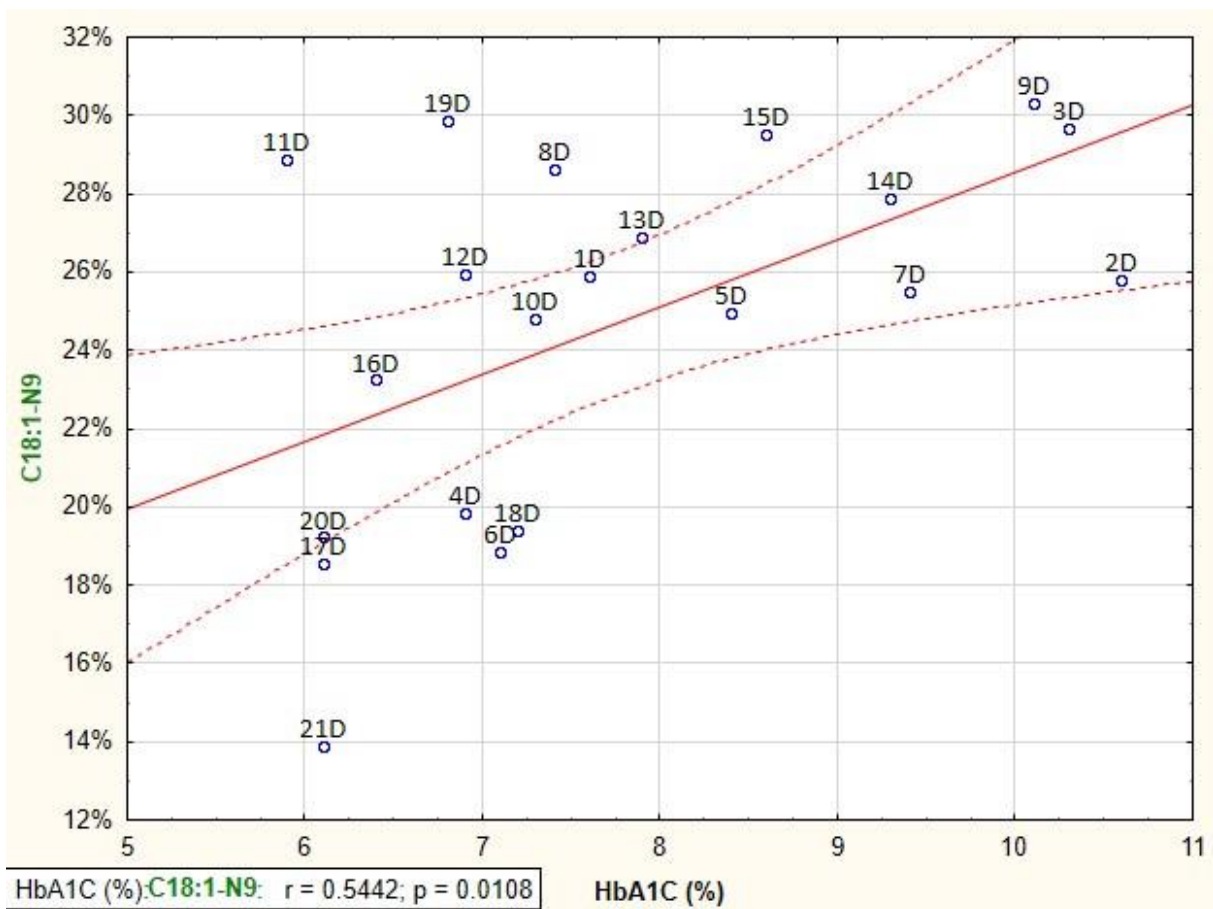
Obrázek 2 Porovnání koncentrace mastných kyselin ve frakci TAG u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



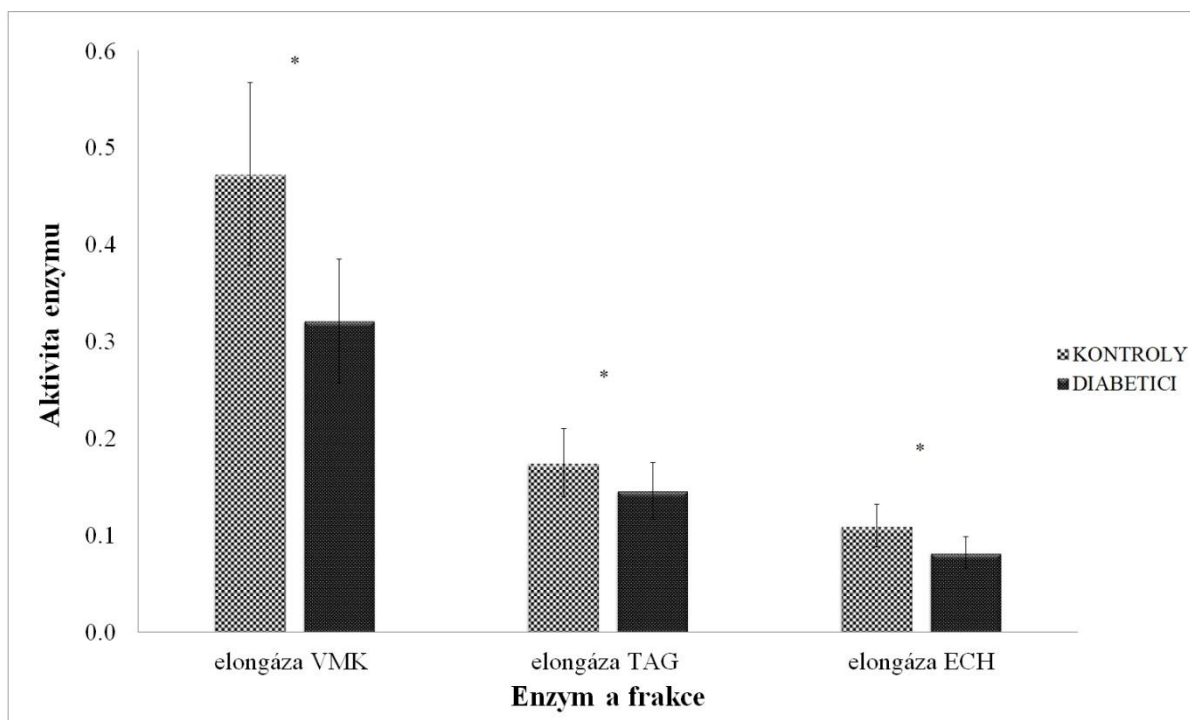
Obrázek 3 Porovnání koncentrace mastných kyselin ve frakci ECH u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



Obrázek 4 Aktivita enzymu Δ9-desaturázy u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2



Obrázek 5 Bodový graf kyseliny olejové v závislosti na glykovaném hemoglobinu ve frakci VMK u diabetiků



Obrázek 6 Aktivita enzymu elongázy u kontrolní skupiny a u diabetiků typu 2

4. Závěr

S rostoucím počtem obézních lidí a nemocných s diabetem typu 2 je současným cílem studovat patogenezi a porušený metabolismus při onemocnění. Studium metabolismu diabetiků je možné odpovědět na důležité otázky týkající se prevence a diagnostiky DMT2. Lipidový metabolismus je nedílnou součástí studia u diabetiků typu 2. Nejenže obezita ve většině případů má majoritní podíl na vzniku tohoto onemocnění, ale celkový lipidový metabolismus se při vzniku tohoto onemocnění zhoršuje. Právě proto jsou mastné kyseliny, ať už pocházející z jiných lipidových tříd, nebo spadající do kategorie volných mastných kyselin, centrem našeho zájmu. V naší práci jsme se zabývali MUFA a hlavními zástupci této skupiny.

Byla zjištěna zvýšená desaturace kyseliny stearové enzymem $\Delta 9$ -desaturázou u diabetiků za vzniku kyseliny olejové. Zvýšení kyseliny trans-vakcenové koreluje s inzulínovou rezistencí. Snížené množství kyseliny nervonové může být způsobené nižší aktivitou enzymu elongázy a tato kyselina může být potencionální marker DMT2 a inzulínové rezistence.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantovým projektem SGS-2018-001 Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

Literatura

- [1] Zeyda M., Stulnig T. M.: *Gerontology* 55 (2009) 379-386.
- [2] Sears B., Perry M.: *Lipids in Health and Disease* 14 (2015) 1-9.
- [3] Ruan H., Lodish H. F.: *Cytokine and Growth Factor Reviews* 14 (2003) 447-455.
- [4] Skyler S. J.: *Atlas of diabetes*, 4th. New York: Springer Science and Business Media, 2012.
- [5] Boden G.: *Diabetes and Obesity* 18 (2011) 139-143.
- [6] Perušičová J. a kol.: *Prediabetes, prehypertenze, dyslipidemie a metabolický syndrom*, 1. Praha: Maxdorf s.r.o., 2012.
- [7] Harvey R. A., Ferrier D. R.: *Lippincott's illustrated reviews: biochemistry*, 6th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
- [8] Wajchenberg B. L.: *Endocrine Reviews* 21 (2000) 1697-1738.
- [9] Saltiel A. R., Kahn R. C.: *Nature* 414 (2001) 799-806.
- [10] Boden G., Laakso M.: *Diabetes Care* 27 (2004) 2253-2259.
- [11] Velasquez C., Vasquez J. S., Balcazar N.: *Diabetes & Metabolism Journal* 41 (2017) 303-315.
- [12] Poitout V., Robertson R. P.: *Endocrinology* 143 (2002) 339-342.
- [13] Hu F. B., van Dam R. M., Liu S.: *Diabetologia* 44 (2001) 805-817.
- [14] Haag M., Dippenaar N. G.: *Medical Science Monitor* 11 (2005) RA 359-367.
- [15] Oda E., Hatada K., Kimura J., Aizawa Y., Thanikachalam P. V., Watanabe K.: *International Heart Journal* 46 (2005) 975-985.