

## Zwiększona ekspresja genu karboksylazy acetylo-CoA w tkankach lipogennych szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek

Marek SZOŁKIEWICZ

Klinika Nefrologii, Transplantologii  
i Chorób Wewnętrznych  
Akademii Medycznej w Gdańsku  
Kierownik:  
Prof. dr hab. med. Bolesław Rutkowski

**Słowa kluczowe:**

- triglicerydy
- lipogeneza
- karboksylaza acetyloCoA
- niewydolność nerek

**Key words:**

- triglycerides
- lipogenesis
- acetylCoA carboxylase
- renal failure

W przewlekłej niewydolności nerek (PNN), hipertriglicerydemia (HTG) jest zjawiskiem powszechnym. Towarzyszy jej zwiększona ekspresja genów syntazy kwasów tłuszczowych i biorących udział w jej regulacji czynników transkrypcyjnych w tkankach lipogennych. Pomimo tego poglądy sugerujące, że HTG jest w części skutkiem zwiększonej syntezy triglicerydów (TG) nadal budzą kontrowersje. W niniejszej pracy zbadano ekspresję genu karboksylazy acetylo-CoA (ACC) – kluczowego enzymu lipogenezy, a także określono szybkość sekrecji TG z wątroby. Badanie ekspresji genu ACC przeprowadzono w wątrobie i tkance tłuszczowej szczurów po dwuetapowej, subtotalnej nefrektomii. Kontrolę stanowiły zwierzęta po zabiegu pozorowanym otrzymujące pokarm w ilości spożywanej przez zwierzęta z PNN (pair-fed). Szybkość sekrecji TG z wątroby określono w obu grupach zwierząt, po zahamowaniu aktywności lipazy lipoproteinowej tyloksapolem. W wątrobie i tkance tłuszczowej szczurów z PNN obserwowano zwiększoną ekspresję genu ACC (na poziomie mRNA i białka) w porównaniu z grupą kontrolną. Towarzyszyło temu zwiększenie aktywności ACC w tkance tłuszczowej. Nie obserwowano wzrostu aktywności ACC w wątrobie. Pomimo tego, u zwierząt z PNN wykazano statystycznie znamienne wzrost sekrecji TG z wątroby, sugerujący ich wzmożoną syntezę. Uzyskane wyniki wskazują na zwiększoną aktywność lipogenezy w doświadczalnej PNN, co sugeruje, iż może być ona jedną z przyczyn HTG obserwowanej w przebiegu tej choroby u ludzi. Przemawia za tym zarówno zwiększona ekspresja genu ACC w tkankach lipogennych, jak i zwiększona sekrecja TG z wątroby. Efekt ten jest niezależny od ilości spożywanego pokarmu. Brak wzrostu aktywności ACC w ekstraktach wątroby (pomimo znacznego wzrostu mRNA ACC oraz poziomu białka ACC) jest prawdopodobnie skutkiem częściowej proteolizy enzymu zachodzącej podczas przygotowywania ekstraktów tkankowych do pomiarów jej aktywności.

(NEFROL. DIAL. POL. 2007, 11, 53-57)

## Enhanced acetyl-CoA carboxylase gene expression in lipogenic tissues of rats with chronic renal failure

Hypertriglicerydemia (HTG) is extremely common in chronic renal failure (CRF). The published reports indicate that it comes along with up-regulation of fatty acid synthase gene expression and transcription factors in lipogenic tissues. However, the opinion suggesting that HTG is partly a result of increased triglycerides (TG) synthesis is still controversial. In the present study we determined gene expression of carboxylase acetyl-CoA (ACC) – a crucial, rate-limiting enzyme of lipogenesis and hepatic triglycerides secreting rate (TGSR). The gene expression study was performed in liver and WAT of rats with CRF induced by two-stage, subtotal nephrectomy. The control group was pair-fed. The hepatic TGSR was estimated after inhibition of TG removal by inactivation of lipoprotein lipase with tyloksapol applied intravenously. In the studied tissues, there was found an increased ACC gene expression (at the level of mRNA and protein) when compared with controls. It was associated with enhanced ACC enzymatic activity in WAT, but this phenomenon was not found in liver. Despite, the hepatic TGSR was in uremic animals significantly enhanced. The results demonstrate that lipogenesis activity is enhanced in CRF confirming the thesis that it could be in part responsible for HTG found in the disease. This thesis is supported by enhancement of ACC gene expression in lipogenic tissues and increased hepatic TGSR. The phenomenon is independent of consumed food amount. The apparent lack of increase in liver ACC activity is likely a result of its degradation during tissue extract preparation.

(NEPHROL. DIAL. POL. 2007, 11, 53-57)

**Adres do korespondencji:**

Marek Szolkiewicz  
Klinika Nefrologii, Transplantologii  
i Chorób Wewnętrznych, Akademia Medyczna  
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7  
Tel.: +48583492505  
e-mail: e.mars@wp.pl

## Wstęp

Przewlekłej niewydolności nerek (PNN) towarzyszą zarówno ilościowe, jak i jakościowe zaburzenia metabolizmu lipidów [2]. Hipertriglicydemia (HTG) jest w tej grupie pacjentów zjawiskiem powszechnym. Główną jej przyczyną jest upośledzenie degradacji triglicerydów (TG). W PNN obserwuje się nie tylko obniżenie aktywności lipaz lipoproteinowej i wątrobowej decydujących o aktywności lipolitycznej osocza [1], ale także obniżenie ekspresji genu receptora lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL) [19].

Istnieje szereg przesłanek przemawiających za tym, iż wysokie stężenie TG w osoczu może być również wynikiem wzmożonej ich syntezy w tkankach lipogennych. Niestety, wyniki przeprowadzonych nad tym zjawiskiem badań są ze sobą sprzeczne. Badania przeprowadzone na modelu zwierzęcym PNN pokazują, iż zarówno w wątrobie, jak w tkance tłuszczowej wyraźnie wzrasta ekspresja genów niektórych enzymów biosyntezy kwasów tłuszczowych [12,15], a także wzrasta ekspresja genu czynników transkrypcyjnych (SREBP-1), które biorą udział w regulacji ekspresji genów enzymów lipogennych [10]. Pomimo tego, głoszenie poglądów sugerujących, iż HTG towarzysząca PNN jest w części także następstwem zwiększonej syntezy TG nadal budzi istotne kontrowersje.

W niniejszej pracy podjęliśmy próbę określenia w wątrobie i tkance tłuszczowej ekspresji genu karboksylazy acetylo-CoA (ACC) (EC 6.4.1.2). ACC jest enzymem kluczowym dla biosyntezy kwasów tłuszczowych, decydującym o szybkości tego procesu [18], a zmiany aktywności ACC są ściśle skorelowane ze zmianami aktywności pozostałych enzymów lipogennych. W następstwie reakcji katalizowanej przez ten enzym powstają cząsteczki malonylo-CoA, które są wykorzystywane do produkcji kwasu palmitynowego w reakcji katalizowanej przez syntazę kwasów tłuszczowych. W kolejnym etapie, kwas palmitynowy ulega procesowi elongacji, a powstałe tą drogą kwasy tłuszczowe (posiadające więcej węgli, aniżeli kwas palmitynowy) są następnie wbudowywane do TG. Przed prawie 30 laty, *Bagdade* i wsp. [3] opublikowali wyniki pracy wskazujące na niską aktywność enzymatyczną ACC w wątrobie zwierząt z PNN. Są to wyniki wskazujące na odmienne zachowanie się aktywności ACC (obniżenie aktywności) w porównaniu do pozostałych enzymów lipogennych, które charakteryzują się wzrostem aktywności w PNN [12,15]. Określając ekspresję genu ACC oraz szybkość sekrecji TG z wątroby próbujemy dowiedzieć, iż lipogeneza bierze aktywny udział w powstawaniu HTG w PNN. Próbujemy również ustalić przyczyny, dla których istnieje rozbieżność pomiędzy wynikami pracy opublikowanej przez *Bagdade* i wsp. [3], a wynikami innych badań nad ekspresją genów enzymów biorących udział w lipogenezie [12,15].

## Materiał i metody

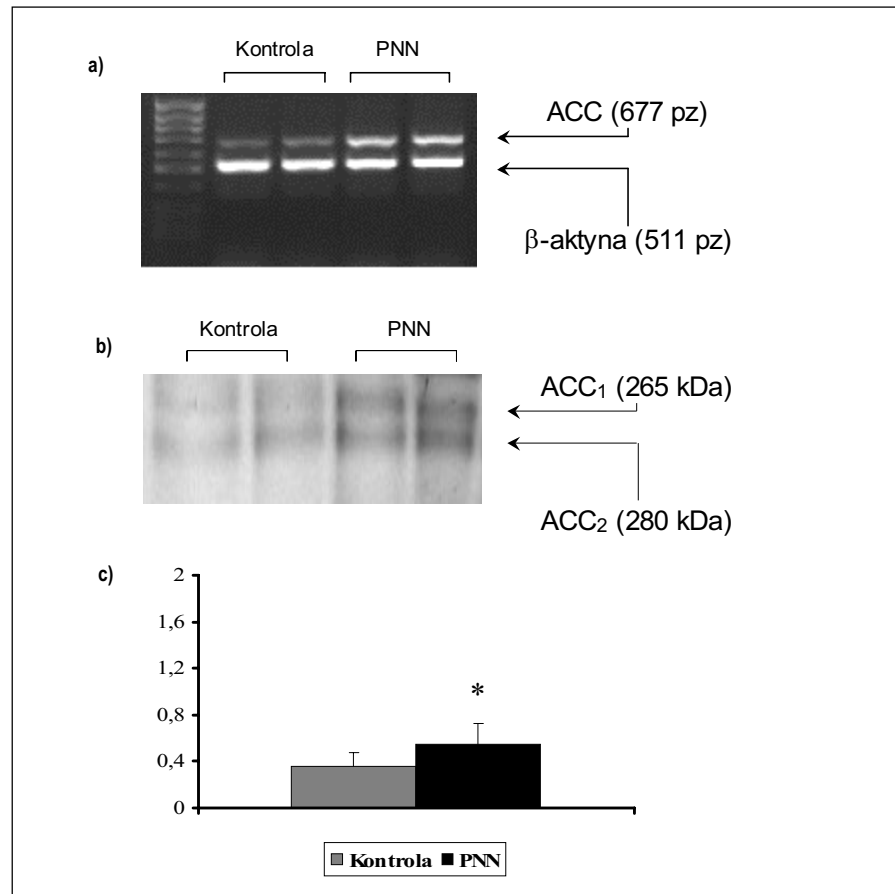
Na prowadzenie badań, uzyskano zgodę Terenowej Komisji Etycznej Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku. Do eksperymentów użyto zwierząt (szczury rasy Wistar, samce) o

Tabela I

Przyrost masy ciała oraz dzienne spożycie paszy laboratoryjnej, a także stężenie kreatyniny, BUN i triglicerydów w surowicy szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) w porównaniu z grupą kontrolną (pair-fed). \*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,02$ .

The body weight increase, daily food consumption and serum creatinine, BUN and triglyceride concentration in chronic renal failure rats (PNN) in comparison to controls (pair-fed). \*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.02$ .

	Przyrost masy ciała (g)	Spożycie paszy (g/d)	Kreatynina (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Triglicerydy (mg/dl)
PNN	22,9 ± 42,8	18,7 ± 3,3	3,65 ± 1,76	197,44 ± 94,52	252,3 ± 79,1
Kontrola	108,3 ± 36,1**	18,1 ± 2,2	0,66 ± 0,13*	19,56 ± 6,16*	40,8 ± 6,7*



Rycina 1

Reprezentatywna analiza RT-PCR mRNA (A), Western blot białka (B) oraz aktywność enzymatyczna (C) karboksylazy acetyloCoA (ACC) w tkance tłuszczowej szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) w porównaniu z grupą kontrolną (pair-fed). Aktywność enzymu wyrażona w nmol/min/mg białka ( $p < 0.05$ ).

The representative RT-PCR mRNA analysis (A), Western blot analysis (B) and enzymatic activity (C) of acetylCoA carboxylase in white adipose tissue of chronically uremic (PNN) and control rats. The enzyme activity in nmol/min/mg białka ( $p < 0.05$ ).

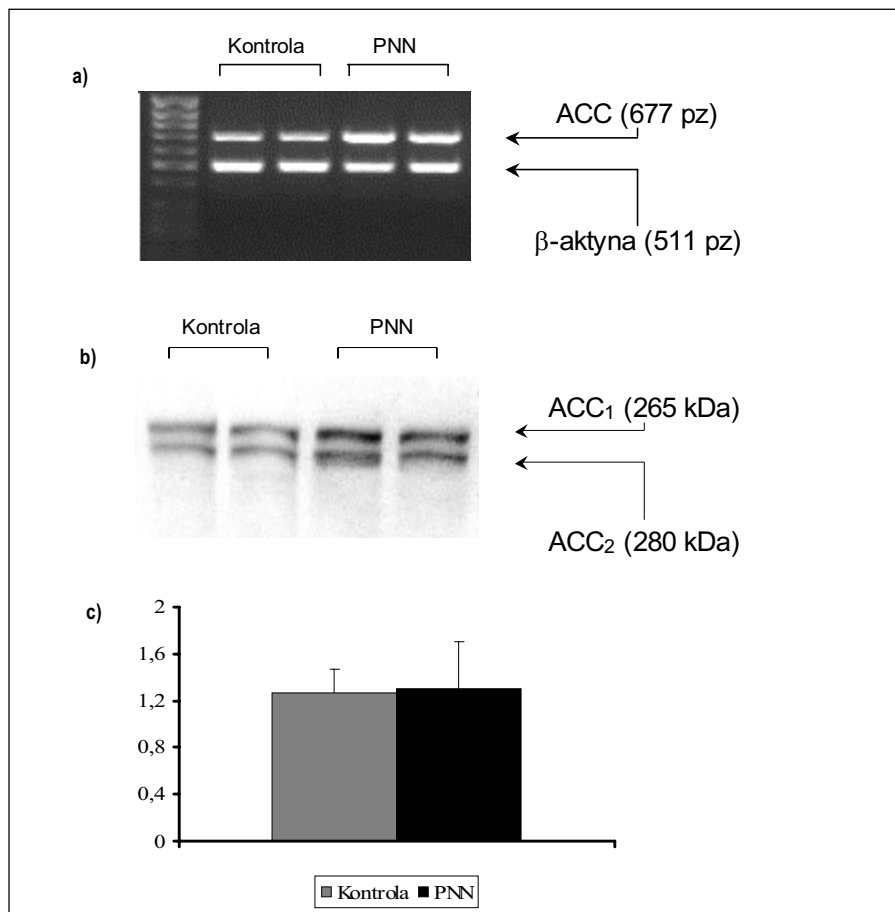
wadze początkowej około 200g, które zostały podzielone na dwie grupy: Grupa I ( $n=7$ ), u której w znieczuleniu ogólnym (Thiopental) metodą chirurgicznej, dwuetapowej, subtotalnej nefrektomii (5/6) wywoływano PNN [9]. Grupa ta miała swobodny dostęp do standardowej paszy laboratoryjnej. Grupa II ( $n=9$ ) to grupa zwierząt kontrolnych, po zabiegu pozorowanym. Grupa II otrzymywała pokarm dokładnie w takiej samej ilości, w jakiej był on spożywany przez zwierzęta grupy I (pair-fed). Po 4 tygodniach od drugiego etapu nefrektomii, po pobraniu krwi do oznaczeń laboratoryjnych, zwierzęta zabijano przez dekapitację. Pobrane fragmenty tkanki (0,5-1,0 g) umieszczano w probówkach *Eppendorf'a*, zamrażano w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu przeprowadzenia analizy. Takie same grupy zwierząt przygotowano do badań nad

sekrecją TG z wątroby.

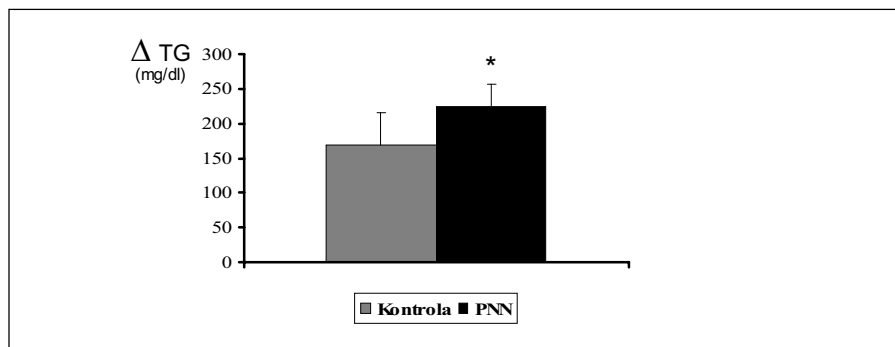
Oznaczenia stężenia kreatyniny, BUN, triglicerydów dokonano przy użyciu metod standardowych korzystając z autoanalyzera firmy Abbott. Aktywność karboksylazy acetylo-CoA oznaczono według metody opisanej wcześniej [9].

### Izolacja RNA i pomiar poziomu mRNA ACC

Całkowity RNA izolowano z zamrożonych tkanek za pomocą metody z rodnikiem guanidyny [4]. Stężenie RNA określono spektrofotometrycznie przy długości fali 260 nm. Z 1 mg całkowitego RNA, wcześniej traktowanego przez 30 minut w  $37^{\circ}\text{C}$  DNazą I (RNase-free DNase I, Fermentas, Lithuania), w reakcji odwrotnej transkrypcji uzyskano cDNA. Otrzymane cDNA posłużyło jako matryca w reakcji kompleksowego PCR ze starterami specyficznymi dla ACC i  $\beta$ -aktyny. Reakcja kompleksowego PCR (ang. *multiplex PCR*) umożliwia rów-



**Rycina 2**  
 Reprezentatywna analiza RT-PCR mRNA (A), Western blot białka (B) oraz aktywność enzymatyczna (C) karboksylazy acetyloCoA (ACC) w wątrobie szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) w porównaniu z grupą kontrolną (pair-fed). Aktywność enzymu wyrażona w nmol/min/mg białka (n.s.).  
 The representative RT-PCR mRNA analysis (A), Western blot analysis (B) and enzymatic activity (C) of acetyl-CoA carboxylase in liver of chronically uremic (PNN) and control rats. The enzyme activity in nmol/min/mg białka (n.s.).



**Rycina 3**  
 Sekrecja triglicerydów (TG) z wątroby szczurów z PNN w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej. Wykres przedstawia średni bezwzględny przyrost stężenia triglicerydów w osoczu badanych zwierząt po upływie 60 minut od podania tyloksapolu ( $p < 0,05$ ).  
 Hepatic triglyceride (TG) secretion rate in rats with chronic renal failure (PNN) in comparison with controls. The figure presents a mean increase of serum triglyceride concentration in 60 minutes after tyloxapol applied intravenously ( $p < 0,05$ ).

noczesną amplifikację transkryptów genów ACC oraz  $\beta$ -aktyny, jako genu referencyjnego. Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 20  $\mu$ l w środowisku zawierającym 1x PCR buffer, 3,5 mM  $MgCl_2$ , 0,5 mM dNTP Mix, 0,5 mM stężenie każdego ze starterów reakcji oraz 0,5 U Polimerazy Taq (Fermentas, Lithuania).

Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR: (ACC) 5'-CCGAGATGTCATTGTCATC-3' i 5'-

ACACCAGTGTAAGACTGTG-3; ( $\beta$ -aktyna) 5'-GAATCGTGCCTGACATTAAG-3' i 5'-GCTAGAAGCATTGCGGTGGA-3'. Produkty reakcji PCR rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym, a następnie analizowano densytometrycznie za pomocą programu Sigma Scan Image (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Poziom ekspresji danego genu wyrażono jako stosunek intensywności prążka odpowiadającego transkryptowi badanego genu do in-

tensywności prążka odpowiadającego transkryptowi genu referencyjnego ( $\beta$ -aktyna). Wyniki ilościowe wyrażone zostały w jednostkach umownych.

#### Pomiar poziomu białka enzymatycznego ACC

Do oznaczenia poziomu białka ACC wykorzystano metodę Western-Blot. Do 0,1 g tkanki, dodawano 1,5 ml buforu (50mM TRIS-HCl pH=7,5, 100 mM NaF, 2 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -merkaptotanol, 10% glicerol, 4  $\mu$ g/ml mieszaniny inhibitorów proteaz) i przeprowadzano homogenizację w ręcznym homogenizatorze szklano-teflonowym. Uzyskany homogenat wirowano w wirówce Sorvall RC-5B (rotor SE-12) przez 30 minut przy 17 tysiącach obrotów. Następnie próbki zawierające po 50  $\mu$ g białka zawieszano w buforze lizującym (Sample Buffer, Laemmli 2 x concentrate – Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) i gotowano 5 minut w 95°C. W ten sposób przygotowane próby nanoszono na 5% żel poliakrylamidowy. Po rozdzielaniu elektroforetycznym, białka przenoszono metodą elektrotransferu na błonę nitrocelulozową (Immobilon P membrane - Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). Otrzymaną membranę inkubowano w buforze blokującym (0,5% albumina) zawierającym streptawidynę znakowaną peroksydazą chrzanową (Perkin Elmer Life Science, Inc). Chemoiluminescencyjny sygnał otrzymano inkubując w odczynniku Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Diagnostics Corporation USA).

Częściową proteolizę białka ACC oceniano przygotowując ekstrakty w buforze stosowanym rutynowo przy dokonywaniu pomiarów aktywności ACC (20 mM Tris-HCl o pH 7,8, 0,2% Triton X-100). Dalej postępowano tak jak opisano powyżej.

#### Badanie szybkości sekrecji TG z wątroby

Po 4 tygodniach od ostatniego zabiegu zwierzętom z PNN oraz zwierzętom grupy kontrolnej pobierano krew z żyły udowej na badania triglicerydów, BUN i kreatyniny, a następnie podawano dożylnie tyloksapol (inhibitor lipazy lipoproteinowej) w dawce 60 mg/100g masy szczura. Po 60 minutach od podania tyloksapolu ponownie pobierano krew z żyły udowej na badania stężenia triglicerydów. Różnica w stężeniu TG przed i po podaniu tyloksapolu jest wykładnikiem szybkości sekrecji TG z wątroby [11].

#### Wyniki

W następstwie dwuetapowej, subtotalnej nefrektomii uzyskano parametry typowe dla PNN (tabela I): kilkukrotny wzrost stężenia kreatyniny ( $p < 0,001$ ) i BUN ( $p < 0,001$ ), którym w porównaniu z grupami kontrolnymi towarzyszył wyraźny, statystycznie znamienny wzrost stężenia TG w osoczu ( $p < 0,01$ ). Przyrost masy ciała (tabela I) był istotnie niższy w grupie zwierząt z PNN, aniżeli w grupie zwierząt kontrolnych (pair-fed) ( $p < 0,02$ ).

W tkance tłuszczowej zwierząt z PNN obserwowano wyraźny wzrost ekspresji genu karboksylazy acetylo-CoA. Poziom mRNA jest w tej grupie znamienne wyższy, aniżeli uzyskany w grupie kontrolnej (pair-fed) ( $0,93 \pm 0,4$  vs.  $0,56 \pm 0,12$ ;  $p < 0,05$ ) (rycina 1A). Podobnie poziom białka ACC jest większy u zwierząt z PNN w porównaniu z grupą kontrolną (rycina 1B). W tkance tłuszczowej zwierząt z PNN obserwowano rów-

nież podwyższoną aktywność enzymatyczną ACC. Była ona znacznie wyższa od tej, obserwowanej u zwierząt kontrolnych (*pair-fed*) ( $p < 0,05$ ) (rycina 1C).

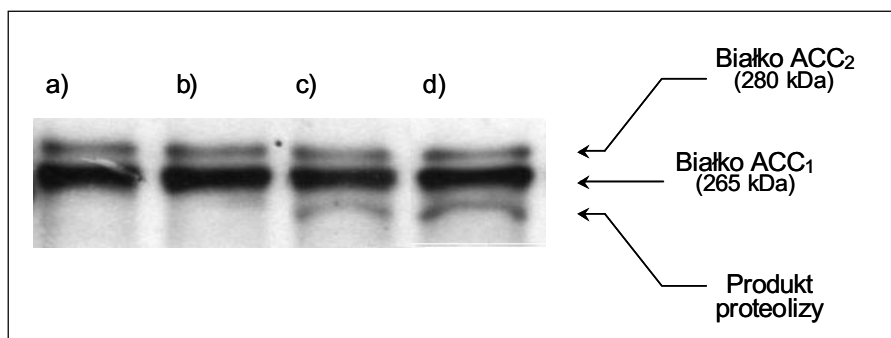
Zmiany poziomu mRNA i białka ACC w wątrobie są podobne do tych, które obserwowano w tkance tłuszczowej. Poziom mRNA w grupie zwierząt z PNN jest znacznie wyższy od tego uzyskanego w grupie kontrolnej (*pair-fed*) ( $1,38 \pm 0,29$  vs.  $0,93 \pm 0,08$ ;  $p < 0,002$ ) (rycina 2A). Także poziom białka ACC jest wyższy u zwierząt z PNN, aniżeli w grupie kontrolnej (rycina 2B). Natomiast, pomimo wyraźnego wzrostu poziomu mRNA i białka ACC w wątrobie zwierząt z PNN, aktywność enzymatyczna ACC nie ulega istotnej zmianie (rycina 2C).

Wynik ten skłonił nas do zbadania szybkości sekrecji TG z wątroby zwierząt z PNN. Okazała się ona być znacznie wyższą, aniżeli w grupie zwierząt kontrolnych (*pair-fed*) ( $p < 0,05$ ) (rycina 3).

W związku z wynikami wskazującymi na wzrost sekrecji TG z wątroby oraz wzrost poziomu mRNA i białka ACC, a jednocześnie brakiem zmian aktywności tego enzymu w wątrobie wysunięto hipotezę, iż aktywność ACC wzrasta w PNN, ale podczas przygotowywania ekstraktów tkankowych do pomiaru aktywności ulega częściowej proteolizie, która skutkuje obniżeniem aktywności enzymu (aktywność mierzona jest niższa od oczekiwanej). Wobec powyższego przeprowadzono doświadczenie, w którym porównano proteolizę ACC w ekstraktach wątroby przygotowanych w buforach zawierających inhibitory proteaz (klasyczne postępowanie podczas wykonywania *Western blot*) oraz w buforze stosowanym do oznaczania aktywności ACC (nie zawierającym inhibitorów proteaz). Ponadto w doświadczeniu tym uwzględniono czas, w którym ACC narażona była na proteolityczne działanie enzymów. Pojawienie się dodatkowych prążków o masie cząsteczkowej niższej od masy natywnego enzymu, świadczy o częściowej proteolizie ACC (rycina 4). Częściowa proteoliza ACC nie występuje jedynie w przypadku, w którym do buforu dodano inhibitory proteaz, a ekstrakt zamrożono natychmiast jego po przygotowaniu (rycina 4). Wyniki tego eksperymentu wskazują, że w czasie przygotowywania ekstraktów tkankowych do oznaczania aktywności ACC dochodzi do częściowej proteolizy enzymu. Można więc przypuszczać, że pomimo wzrostu ekspresji genu ACC w wątrobie szczurów z PNN, w warunkach *in vitro* dochodzi do obniżenia aktywności enzymu spowodowanej jego proteolizą. Wydaje się, że aktywność w ekstraktach tkankowych jest wypadkową dwóch procesów: a) wzrostu aktywności towarzyszącej PNN; b) spadku aktywności związanej z proteolizą enzymu. Ponieważ istnieją dwie izoformy ACC (różniące się między innymi masami cząsteczkowymi) określane jako ACC1 i ACC2 [18], na rycinach 1B, 2B i 4 widoczne są dwa prążki odpowiadające tym izofomom ACC.

#### Omówienie

Wyniki badań przedstawione w niniejszej pracy rzucają nowe światło na problem lipogenezy w PNN. W tkankach lipogennych szczurów z PNN zwiększa się ekspresja



Rycina 4

Analiza Western blot białka karboksylazy acetyloCoA (ACC) w wątrobie szczurów z przewlekłą niewydolnością nerek. Kolejne ścieżki przedstawiają elektroforezę ekstraktów przygotowanych: a) w buforze A, zamrożony zaraz po przygotowaniu; b) w buforze B, zamrożony zaraz po przygotowaniu; c) w buforze B, zamrożony po odstawieniu na 160 minut w temperaturze 4°C; d) w buforze A, 3-krotnie rozmrażanych i przechowywanych w temperaturze -20°C (bufor A - z dodatkami inhibitorów proteaz; bufor B - bez inhibitorów proteaz). Western blot analysis of liver acetylCoA carboxylase (ACC) protein in rats with chronic renal failure. The figure presents the paths with extracts electrophoresis prepared: a) in buffer A, frozen right after preparation; b) in buffer B, frozen right after preparation; c) in buffer B, frozen after 160 minutes preservation in 4°C; d) in buffer A, 3 times unfrozen and preserved in -20°C (buffer A - with proteases inhibitors; buffer B - without proteases inhibitors).

genu ACC, podobnie jak ekspresja genów pozostałych enzymów lipogennych oraz czynników transkrypcyjnych [10,12,13,15]. Na tej podstawie można wysnuć wniosek, iż PNN generuje w wątrobie i tkance tłuszczowej zmiany podobne, sprzyjające zwiększonej aktywności lipogennej. Na podstawie tych wyników można przypuszczać, że aktywność lipogenezy jest zwiększona i przyczynia się, przynajmniej częściowo, do rozwoju HTG obserwowanej w PNN.

Zwiększona sekrecja TG z wątroby to oczywiście efekt końcowy, do którego prowadzi podwyższona aktywność biosyntezy kwasów tłuszczowych i produkcji TG w wątrobie. Nie można jednak wykluczyć, że w nadprodukcję TG w przebiegu PNN zaangażowany jest dodatkowo wzmocniony napływ kwasów tłuszczowych do wątroby. Udokumentowana zwiększona aktywność lipogenna tkanki tłuszczowej [10,14] powinna (wskutek nadprodukcji TG) skutkować zwiększeniem jej masy. Jednak przyrost masy ciała tych zwierząt jest niewielki, a ilość tkanki tłuszczowej znikoma. Najpewniej zwiększonej aktywności lipogennej tkanki tłuszczowej towarzyszy nasiloną aktywność lipolityczna. Jej efektem jest powiększenie puli krążących wolnych kwasów tłuszczowych, które mogą być wychwytywane przez wątrobę i wykorzystywane do produkcji TG w wątrobie.

Mechanizmy prowadzące do zwiększonej ekspresji genu ACC w wątrobie i tkance tłuszczowej zwierząt z PNN nie są dobrze poznane. Podwyższone stężenie insuliny obecne w surowicy zwierząt z PNN jest niewątpliwie jednym z najważniejszych czynników mogących za to zjawisko odpowiadać [16]. W jednej z ostatnich prac wykazaliśmy w tkance tłuszczowej szczurów z PNN zwiększoną ekspresję genu (na poziomie mRNA i ilości białka) czynnika transkrypcyjnego z rodziny SREBP, a dokładnie izoformy SREBP-1 (z ang: *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) [14]. Czynniki transkrypcyjne odgrywają kluczową rolę w regulacji metabolizmu lipidów, a czynnik SREBP-1c jest głównie odpowiedzialny za aktywację transkrypcji genów związanych z syntezą kwasów tłuszczowych i triglicerydów [8].

Jego wysoki poziom obserwowany w wątrobie i tkance tłuszczowej w PNN jest przyczyną zwiększonej ekspresji genów enzymów lipogennych, w tym ACC. Oznacza to, iż czynniki wpływające na poziom czynników transkrypcyjnych SREBP, wpływają również na ekspresję genów enzymów biorących udział w lipogenezie. W ten właśnie sposób na proces biosyntezy kwasów tłuszczowych i syntezę triglicerydów wpływa wspomniana wcześniej insulina [6]. Ale takim działaniem charakteryzują się również inne hormony (androgeny, progesteron), dieta bogatowęglowodanowa [6,7], a przede wszystkim niektóre mediatory stanu zapalnego i cytokiny (np. PDGF, z ang: *Platelet-Derived Growth Factor*) [5]. PNN jest uważana za przewlekły stan zapalny z udokumentowanym wzrostem aktywności wielu mediatorów stanu zapalnego [20]. Oznacza to, iż ten mechanizm prowadzący do zwiększonej aktywności czynników transkrypcyjnych, a przez to zwiększonej aktywności transkrypcyjnej genów związanych z syntezą kwasów tłuszczowych i triglicerydów w PNN należy również brać pod uwagę.

Pośród uzyskanych przez nas wyników zastanawiający jest brak wzrostu aktywności ACC w wątrobie. Biorąc pod uwagę zwiększoną ekspresję genu ACC i całą aktywność lipogenną wątroby, należałoby się spodziewać (podobnie jak ma to miejsce w tkance tłuszczowej) wzrostu aktywności tego enzymu w wątrobie. Takiego wyniku nie udało się nam uzyskać. Pozornie więc, wyniki wyglądają na niespójne. Jednakże ACC jest enzymem o bardzo precyzyjnym, wrażliwym na zmiany i skomplikowanym systemie regulacji, m.in. poprzez mechanizm fosforylacji-defosforylacji, polimeryzacji-depolimeryzacji, regulacji allosterycznej. Zmiany aktywności tego enzymu w zależności od potrzeb mogą dokonywać się w niezmiernie krótkim czasie. A warto podkreślić, iż w przeciwieństwie do tkanki tłuszczowej, wątroba zawiera wiele niespecyficznych enzymów z grupy proteaz, które to podczas przygotowywania ekstraktu do pomiaru aktywności ACC mogą prowadzić do częściowej proteolizy enzymu zaniżając jego rzeczywistą aktywność enzymatyczną. W niniejszej

pracy dowiedliśmy, iż to zjawisko może odpowiadać za brak wzrostu aktywności wątrobowej ACC. Podczas przygotowywania ekstraktu tkankowego może dochodzić do częściowej proteolizy enzymu (rycina 4). Te wyniki pozwalają nam bezpiecznie podtrzymać tezę, że aktywność procesu lipogenezy w warunkach PNN jest podwyższona, a jednym z tego efektów jest obserwowana HTG.

#### Wnioski

Wyniki prezentowanej pracy wskazują, iż ekspresja genu ACC w wątrobie i tkance tłuszczowej szczurów z PNN jest w stopniu istotnym zwiększona, a wzrost ten jest niezależny od ilości spożywanego pokarmu. Towarzyszy temu zwiększona sekrecja TG z wątroby, przyczyniając się tym samym do rozwoju HTG obserwowanej w przebiegu tej choroby. Pozorny brak wzrostu aktywności enzymatycznej ACC w wątrobie mierzony *in vitro* jest prawdopodobnie następstwem częściowej proteolizy enzymu, do której dochodzi podczas preparowania ekstraktu do pomiarów jego aktywności.

#### Piśmiennictwo

1. **Arnadottir M.**: Pathogenesis of dyslipoproteinemia in renal insufficiency: the role of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1997, 57, 1.
2. **Attman P.O., Alaupovic P.**: Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia. The relation to renal function and dialysis. *Nephron* 1991, 57, 401.
3. **Bagdade J.D., Yee E., Wilson D.E. et al.**: Hyperlipidemia in renal failure: studies of plasma lipoproteins, hepatic triglyceride production and tissue lipoprotein lipase in a chronically uremic rat model. *J. Lab. Clin. Med.* 1978, 91, 176.
4. **Chomczynski P., Sacchi N.**: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, 156.
5. **Demoulin J.B., Ericsson J., Kallin A. et al.**: Platelet-derived growth factor stimulates membrane lipid synthesis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase and sterol regulatory element-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 35392.
6. **Foretz M., Guichard C., Ferre P., et al.**: Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96, 12737.
7. **Horton J.D., Bashmakov Y., Shimomura I. et al.**: Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 5987.
8. **Horton J.D., Goldstein J.L., Brown M.S.**: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 2002, 109, 1125.
9. **Kochan Z., Karbowska J., Świerczyński J.**: Unusual increase of lipogenesis in rat white adipose tissue after multiple cycles of starvation-refeeding. *Metabolism* 1997, 46, 10.
10. **Korczyńska J., Stelmańska E., Nogalska A. et al.**: Upregulation of lipogenic enzymes genes expression in white adipose tissue of rats with chronic renal failure is associated with higher level of sterol regulatory element binding protein-1. *Metabolism* 2004, 53, 1060.
11. **Man Z.W., Hirashima T., Mori S. et al.**: Decrease in triglyceride accumulation in tissues by restricted diet and improvement of diabetes in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, a non-insulin-dependent diabetes model. *Metabolism* 2000, 49, 108.
12. **Rutkowski B., Szolkiewicz M., Korczyńska J. et al.**: The role of lipogenesis in the development of uremic hyperlipidemia. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 41, S84.
13. **Szolkiewicz M., Chmielewski M., Nogalska A. et al.**: The potential role of sterol regulatory element binding protein transcription factors in the renal injury. *J. Ren. Nutr.* 2007, 17, 62.
14. **Szolkiewicz M., Kochan Z., Świerczyński J. et al.**: Lipogenesis in experimental renal failure in rats. *Renal Failure* 2001, 23, 621.
15. **Szolkiewicz M., Niewęglowski T., Korczyńska J. et al.**: Up-regulation of fatty acid synthase gene expression in experimental chronic renal failure. *Metabolism* 2002, 51, 1605.
16. **Szolkiewicz M., Sucajtyś E., Wołyniec W. et al.**: Mechanisms of enhanced carbohydrate and lipid metabolism in adipose tissue in uremia. *J. Ren. Nutr.* 2005, 15, 166.
17. **Świerczyński J., Korczyńska J., Szolkiewicz M. et al.**: Low leptin mRNA level in adipose tissue and normoleptinemia in experimental chronic renal failure. *Exp. Nephrol.* 2001, 9, 54.
18. **Tong L.**: Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2005, 62, 1784.
19. **Vaziri N.D., Liang K.**: Down-regulation of VLDL receptor expression in chronic experimental renal failure. *Kidney Int.* 1997, 51, 913.
20. **Zoccali C., Mallamaci F., Tripepi G.**: Inflammation and atherosclerosis in end-stage renal disease. *Blood Purif.* 2003, 21, 29.