

**Związki lipidowe zawarte w owocach rokitnika zwyczajnego
(*Hippophae rhamnoides* L.) jako ligandy receptorów sprzężonych
z białkiem G zaangażowanych w utrzymanie homeostazy glukozy**

mgr inż. Eliza Korkus

Promotor:
dr hab. Edyta Gendaszewska-Darmach, prof. uczelni

Otyłość i towarzyszące jej choroby, takie jak cukrzyca typu 2 (ang. Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM) stanowią jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych na całym świecie. W tym kontekście poszukuje się nowych leków przeciwcukrzycowych, w tym ukierunkowanych na aktywację receptorów sprzężonych z białkiem G (z ang. G Protein-Coupled Receptor, GPCR). Konieczne jest także opracowanie nowych strategii żywieniowych mogących łagodzić dolegliwości związane z tymi chorobami. Potencjalnym kandydatem mogącym wzbogacać dietę osób cierpiących na choroby metaboliczne jest rokitnik zwyczajny (*Hippophae rhamnoides* L.). Olej z jego owoców jest źródłem wielu substancji bioaktywnych, takich jak kwasy tłuszczowe, karotenoidy, sterole i tokole. Owoce rokitnika są także surowcem szczególnie bogatym w izomer *cis* jednonienasyconego kwasu palmitooleinowego (ang. Palmitooleic Acid, POA), znanego także jako kwas 9-heksadecenowy (16:1n-7). Badania przedkliniczne i epidemiologiczne dowodzą, że POA wpływa korzystnie na parametry metaboliczne zaburzone w T2DM i otyłości. Z drugiej strony, wiele badań wskazuje na korelację między podwyższonym poziomem POA w surowicy a T2DM, zaostrzonym stanem zapalnym, chorobą wieńcową lub stłuszczeniem wątroby. Co więcej, POA istnieje w postaci dwóch izomerów: *cis* i *trans*. Izomer *trans* jest syntezowany w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy i występuje w niewielkich ilościach w produktach przemysłu mleczarskiego. Istnieją opinie, że w przeciwieństwie do szkodliwych dla zdrowia izomerów *trans* otrzymywanych w procesach utwardzania (uwodornienia) olejów roślinnych, izomer *trans* kwasu palmitooleinowego ma korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Jednakże w wielu publikacjach (nawet tych najnowszych) brak jest informacji, który z izomerów POA był przedmiotem badań. Brak jest także badań porównawczych na temat aktywności biologicznych obu izomerów.

W świetle kontrowersyjnych danych na temat POA oraz rosnącego zainteresowania włączaniem do diety oleju z owoców rokitnika, konieczne staje się przeprowadzenie porównawczych badań aktywności izomerów *cis* i *trans* kwasu palmitooleinowego oraz olejów z owoców rokitnika. W niniejszej rozprawie doktorskiej oceniono potencjał przeciwcukrzycowy oleosomów pochodzących z pięciu odmian owoców rokitnika zwyczajnego (Prozracznaja, Luczystaja, Golden Rain, Botaniczeskaja Ljubitel'skaja i Maryna) oraz olejów z odmiany Luczystaja. Owoce tej odmiany użyto do przygotowania oleju tłoczonego na zimno, ekstrahowanego z wykorzystaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym, ekstrahowanego heksanem lub acetonem metodą Soxhleta. Z oleju ekstrahowanego heksanem uzyskano także olej oczyszczony węglem aktywnym oraz estry etylowe kwasów tłuszczowych rokitnika zwyczajnego. Badane oleosomy i oleje poddano również procesowi lipolizy naśladującej proces ich trawienia w przewodzie pokarmowym.

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że trawiony olej ekstrahowany heksanem metodą Soxhleta oraz trawiony olej oczyszczony węglem aktywnym w najwyższym stopniu stymulują wydzielanie insuliny stymulowanej glukozą (ang. Glucose-Stimulated Insulin Secretion, GSIS), aktywując cztery receptory zaangażowane w utrzymanie homeostazy glukozy i lipidów (GPR40, GPR55, GPR119 oraz GPR120). Zarówno cytotoksyczne działanie badanych

olejów, jak i ich aktywność insulintropowa wynikała z obecności wolnych kwasów tłuszczowych (ang. Free Fatty Acid, FFA) uwolnionych w wyniku trawienia *in vitro*. Potwierdzono to badając aktywność poszczególnych kwasów tłuszczowych obecnych w oleju z owoców rokitnika (w stężeniach odpowiadających ich zawartości w oleju) oraz ich mieszaniny. Najwyższą indukcję wydzielania insuliny spośród wszystkich kwasów zawartych w oleju z owoców rokitnika wykazał kwas palmitooleinowy. Wiązał się on także ze wszystkimi badanymi receptorami GPCR, preferując wiązanie z GPR40, co potwierdzono w badaniach modelowania molekularnego wykonanych w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.

W wyniku przeprowadzonych analiz składu oleosomów otrzymanych z owoców pięciu odmian rokitnika zwyczajnego, wykonanej na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim, odmianę Golden Rain uznano za najcenniejszą pod względem wysokiej zawartości POA i karotenoidów. Należy jednak zaznaczyć, że różnice zawartości POA nie różniły się istotnie między odmianą Golden Rain (32.8 ± 0.0 g/100 g oleju), a kolejną pod względem ilości POA odmianą Luczystaja (31.7 ± 0.0 g/100 g oleju). Wszystkie trawione oleosomy wykazały większy potencjał cytotoksyczny względem komórek β trzustki linii mysiej MIN6 oraz ludzkiej EndoC- β H1 niż nietrawione próby. W kolejnym etapie pracy zbadano zdolność oleosomów do indukowania GSIS. Trawione oleosomy otrzymane z owoców rokitnika odmiany Maryna wykazały najwyższą aktywność insulintropową w komórkach β trzustki myszy i człowieka.

Kierując się koniecznością porównania aktywności biologicznej izomerów POA zbadano ich wpływ na komórki β trzustki MIN6 oraz EndoC- β H1. Udowodniono, że tPOA wykazuje niższą cytotoksyczność niż cPOA w stosunku do badanych linii komórek trzustki. Izomery POA indukują sekrecję insuliny na podobnym poziomie zarówno w mysich, jak i ludzkich komórkach β trzustki, aktywując receptory GPR40, GPR55, GPR119 i GPR120. Izomer trans może aktywować GPCR zarówno poprzez szlak związany z aktywacją białka Gq, jak i Gs, natomiast izomer cis działa tylko przez białko Gq. Z wykorzystaniem modelowania molekularnego wykazano największe powinowactwo cPOA i tPOA do receptora GPR40.

Inne związki lipidowe zawierające reszty kwasów tłuszczowych, takie jak lizofosfatydylocholino (ang. Lysophosphatidylcholine, LPC) zidentyfikowano wcześniej jako agonistów receptorów GPR40, GPR55 i GPR119. Nie określono jednak do tej pory aktywności LPC z łańcuchem acylowym kwasów cPOA i tPOA jako potencjalnych ligandów w/w GPCR. LPC zawierające w pozycji sn-1 łańcuchy acylowe izomerów cis i trans kwasu palmitoleinowego zostały zsyntetyzowane w Katedrze Chemii Żywności i Biokatalizy Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Związki te indukowały wyrzut insuliny z podobną siłą, silnie aktywując receptor GPR119 i inicjując kaskadę Gs. Dzięki metodom modelowania molekularnego odkryto preferencję wiązania tPOA-LPC do receptora GPR119.

Ze względu na udział hormonów inkretynowych w stymulacji wydzielania insuliny, w ostatnim etapie pracy zbadano wpływ olejów z owoców rokitnika zwyczajnego oraz izomerów POA na stymulację wydzielania glukagonopodobnego peptydu 1 (ang. Glucagon-Like Peptide 1, GLP-

1) w enteroendokrynnych komórkach jelita – mysiej linii GLUTag i ludzkiej NCI-H716. Jednakże zarówno badane oleje, jak i POA nie wpływały na poziom sekrecji GLP-1 w obu liniach komórkowych.

W niniejszej rozprawie doktorskiej zanalizowano wpływ olejów z owoców rokitnika zwyczajnego oraz zawartych w nim FFA na metabolizm glukozy i lipidów. Udowodniono, że potencjał insulinotropowy badanych związków wynika z aktywności FFA działających jako ligandy dla wybranych receptorów GPCR obecnych w błonie komórek β trzustki. Wykonane badania pozwoliły określić różne mechanizmy sekrecji insuliny indukowane przez izomery cis i trans POA. Zidentyfikowano również LPC z resztami kwasu POA jako ligandy dla receptora GPR119. Uzyskane wyniki dostarczają nowej wiedzy na temat aktywności izomerów kwasu POA oraz udawadniają, że badane oleje i oleosomy można wykorzystać jako dodatki wzbogacające żywność w terapiach przeciwcukrzycowych.