



UNIWERSYTET MEDYCZNY W BIAŁYMSTOKU

Wydział Nauk o Zdrowiu

Damian Pogodziński

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Ocena wpływu zmienności SNP genu desaturazy stearoilo-CoA (SCD)
jądrowego DNA i genu MT-ATP6 mitochondrialnego DNA na zmienność
fenotypową tkanki tłuszczowej podskórnej oraz trzewnej*

Promotor pracy: Prof. dr hab. n. med. Lucyna Ostrowska

Kierownik Zakładu Dietetyki i Żywienia Klinicznego

Białystok 2023

Serdeczne podziękowania składam

***Pani Prof. dr hab. n. med. Lucynie Ostrowskiej
za opiekę merytoryczną, poświęcony czas,
cierpliwość i wyrozumiałość, wiarę, naukową
inspirację oraz umożliwienie poszerzania naukowych horyzontów.***

***Pani Profesor dr hab. n. med. Małgorzacie Żendzian-Piotrowskiej
za nieocenioną pomoc i wsparcie w trudnych chwilach.***

***Koleżankom z Zakładu Dietetyki i Żywienia Klinicznego
za pomoc, cenne rady i wskazówki
oraz wspaniałą atmosferę pracy.***

***Żonie za wiarę, wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość
bez których praca nad ukończeniem badań
byłaby o wiele trudniejsza.***

***Kierownikowi Epi-Centrum Nauki Markowi Jurzyście
za wyrozumiałość i wsparcie w miejscu pracy podczas prowadzenia badań.***

Damian Pogodziński

Spis treści

Wykaz skrótów	5
I. Wstęp	8
1.1. Otyłość (epidemiologia, patogeneza).....	8
1.2. Epidemiologia otyłości.....	9
1.3. Typy otyłości.....	11
1.4. Genetyczne podstawy otyłości	13
1.4.1. MT-ATP6 – gen mitochondrialny łączony z otyłością.....	17
1.4.2. Gen SCD i jego rola w otyłości	19
1.4.3. SCD1 w metabolizmie wątroby	20
1.5. Rodzaje tkanki tłuszczowej.....	23
1.5.1. Biała tkanka tłuszczowa (WAT).....	23
1.5.2. Brązowa tkanka tłuszczowa.....	24
1.5.3. Beżowa tkanka tłuszczowa	25
1.5.4. Różowa tkanka tłuszczowa	26
1.5.5. Tkanka tłuszczowa szpiku kostnego	27
1.6. Fenotypy rozmieszczenia tkanki tłuszczowej	27
II. Cele pracy	29
III. Materiał i metody.....	30
3.1. Analiza parametrów antropometrycznych i składu ciała	30
3.2. Badania biochemiczne krwi.....	31
3.3. Izolacja DNA	31
3.4. Gen MT-ATP6 – reakcja łańcuchowa polimerazy PCR.....	32
3.5. Gen SCD – reakcja łańcuchowa polimerazy PCR.....	32
3.6. Analizy statystyczne oraz bioinformatyczne	33
IV. Wyniki	35
4.1. Charakterystyka badanych grup pod względem parametrów antropometrycznych	35
4.2. Ocena zróżnicowania genetycznego w genie MT-ATP6 u osób z różnym stopniem odżywienia.....	37
4.3. Ocena fenotypów rozmieszczenia tkanki tłuszczowej brzusznej (TOFI i FOTI).....	41
4.4. Analiza przynależności fenotypów FOTI i TOFI do haplotypów genu MT-ATP6	41
4.5. Ocena wybranych parametrów biochemicznych w surowicy (na czczo) wśród osób obu badanych grup.....	43
4.6. Analiza obecności alleli SNP rs7849.....	44
4.7. Analiza wpływu alleli SNP rs7849 na parametry biochemiczne krwi.	46
V. Dyskusja.....	49

5.1. Zmienność genu MT-ATP6	50
5.2. Polimorfizmy genu SCD a gospodarka węglowodanowa i lipidowa badanych osób ...	55
VI. Wnioski.....	62
VII. Streszczenie w języku polskim	63
VIII. Streszczenie w języku angielskim	65
XI. Wykaz piśmiennictwa.....	69
X. Wykaz tabel	78
XI. Wykaz rycin.....	79
XII. Zgody Komisji Bioetycznej	80

Wykaz skrótów

ACC – karboksylaza acetylo-koenzymu A

ADRB3 - Receptor beta-3 adrenergiczny (*ang.* - beta-3 adrenergic receptor)

AMPK - kinaza aktywowana 5'AMP (*ang.* 5'AMP-activated protein kinase)

AS – Zespół Alströma (*ang.* Alström syndrome)

ATGL – lipaza triglicerydowa tłuszczowa (*ang.* adipose triglyceride lipase)

ATP - adenozy-no-5'-trifosforan (*ang.* - adenosine triphosphate)

BAT – brązowa tkanka tłuszczowa (*ang.* brown adipose tissue)

BBS – Zespół Bardet-Biedl (*ang.* Bardet-Biedl syndrome)

BDNF36 – gen neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (*ang.* *brain-derived neurotrophic factor*)

BMAT – tkanka tłuszczowa szpiku kostnego (*ang.* bone marrow adipose tissue)

BMI – wskaźnik masy ciała (*ang.* Body Mass Index)

BMR – tempo metabolizmu podstawowego (*ang.* basal metabolic rate)

CDC - Amerykańskie Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (*ang.* Centers for Disease Control and Prevention)

CHREBP - białko wiążące elementy reagujące na węglowodany (*ang.* Carbohydrate response element binding protein)

CNR1 - receptor kannabinoidowy typu 1 (*ang.* - cannabinoid receptor 1)

CNV - *ang.* *copy number variation*, zmienność liczby kopii DNA

CoA - acetylo-koenzym A

CS - Zespół Cohen (*ang.* Cohen syndrome)

CytB – mitochondrialny cytochrom b

DXA - Absorpcjometria promieniowania rentgenowskiego o podwójnej energii

ER - retikulum endoplazmatyczne

FA - kwasy tłuszczowe (*ang.* – fatty acids)

FFA - wolne kwasy tłuszczowe (*ang.* free fatty acids)

FOFI - otyły na zewnątrz, otyły w środku (*ang.* - fat outside, fat inside)

FOTI - *ang.* *fat outside thin inside*,

FTO – *ang.* *fat mass and obesity-associated protein*, masa tłuszczowa i białko związane z otyłością

GLUT1 - transporter glukozy 1 (*ang.* glucose transporter 1)

GLUT2 – transporter glukozy 2 (*ang.* glucose transporter 2)

GLUT4 – transporter glukozy 4 (*ang.* glucose transporter 4)

GPRC5B70 - Receptor sprzężony z białkiem G Klasa C Grupa 5 Członek B (*ang.* - G protein-coupled receptor class c group 5 member B)

GWAS - badania asocjacyjne całego genomu (*ang.* genome-wide association study)

HCD – dieta wysokowęglowodanowa (*ang.* high carbohydrate diet)

HDL – lipoproteina o wysokiej gęstości (*ang.* – high-density lipoprotein)

He - heterozygotyczność spodziewana (heterosigosity expected)

HFD – dieta bogato tłuszczowa (*ang.* high fat diet)

Ho - heterozygotyczność obserwowana (*ang.*- heterosigosity observed)

HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności

HSL – lipaza hormonowrażliwa (*ang.* hormone-sensitive lipase)

IL-1 β - interleukina-1 β

IL-6 - interleukina 6

LD - dysekwilibrum łącznie (*ang.* linkage disequilibrium)

LDL – lipoproteina o niskiej gęstości (*ang.* low-density lipoprotein)

LEPR – gen kodujący leptynę (*ang.* leptin receptor)

LXR - receptor wątroby X

MC4R – receptor melanokortyny 4 (*ang.* – melanocortin 4 receptor)

MITOMAP - baza danych ludzkiego genomu mitochondrialnego

MONW – zespół metabolicznej otyłości z normalną masą ciała (*ang.* metabolically obese, normal weight)

mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy

MT-ATP6 - mitochondrialnie kodowana podjednostka 6 błony syntazy ATP

mtDNA – mitochondrialny kwas deoksyrybonukleinowy

MUFA - jednonienasycone kwasy tłuszczowe (*ang.* - monounsaturated fatty acids)

NAD(P)H - Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (*ang.* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NEGR1 - neuronowy regulator wzrostu 1 (*ang.* - neuronal growth regulator 1)

ob – gen związany z otyłością (*ang.* human obese gene)

ob/ob – myszy z otyłością (*ang.* mouse with obesity)

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy (*ang.* – polymerase chain reaction)

PCSK1 - konwertaza proproteinowa 1 (*ang.* - proprotein convertase 1)

PPARG40 - Receptor gamma aktywowany przez proliferatory peroksysomów (*ang.* - peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

PPAR γ 2 - gen receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma 2 (*ang.* peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2)

PPYR1 – gen receptora 1 polipeptydu trzustki (*ang.* pancreatic polypeptide receptor 1)

PTP1B - niereceptorowa fosfataza tyrozynowo-białkowa typu 1 (*ang.* - protein tyrosine phosphatase 1B)

PUFA – wielonasycone kwasy tłuszczowe (*ang.* polyunsaturated fatty acids)

PWS - zespół Pradera-Labharta-Williego (*ang.* Prader-Willi syndrome)

pz – par zasad

SAT –podskórna tkanka tłuszczowa (*ang.* subcutaneous adipose tissue)

SCD - desaturaza stearoilo-CoA (*ang.* stearyl-CoA desaturase)

SFA - nasycone kwasy tłuszczowe (*ang.* saturated fatty acids)

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu (*ang.* single nucleotide polymorphism)

SREBP-1c - białko wiążące element regulujący sterol-1c (*ang.* sterol regulatory element-binding protein 1)

T2D – cukrzyca typu II

TG – triglicerydy (*ang.* triglycerides)

TNF α - czynnik martwicy nowotworów α

TOFI – *ang.* thin outside fat inside,

TOTI - chudy na zewnątrz, chudy wewnątrz (*ang.* - thin outside, thin inside)

UCP1 - białko rozprzegające w mitochondriach brązowych adipocytów (*ang.* uncouple protein)

VAT – trzewna tkanka tłuszczowa (*ang.* visceral adipose tissue)

VLDL - lipoproteina o bardzo niskiej gęstości (*ang.* very low-density lipoprotein)

WAT – biała tkanka tłuszczowa (*ang.* white adipose tissue)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (*ang.* World Health Organization)

ZM – zespół metaboliczny

I. Wstęp

1.1. Otyłość (epidemiologia, patogeneza)

Otyłość bardzo często jest piętnowana i niesie ze sobą fałszywe przekonanie, że wynika jedynie z niewłaściwych zachowań i nawyków żywieniowych oraz niedostatecznej aktywności fizycznej. Istnieje jednak bogata literatura oparta na dowodach, która przedstawia otyłość jako skomplikowany, przewlekły stan chorobowy spowodowany wzajemnym oddziaływaniem wielu czynników: genetycznych, środowiskowych, metabolicznych i behawioralnych. W 2008 roku panel ekspertów z Obesity Society stwierdził, że „otyłość jest złożonym schorzeniem, na które składa się wiele przyczyn, w tym czynniki, które są w dużej mierze poza kontrolą poszczególnych osób oraz że otyłość powoduje wiele cierpienia i przyczynia się do złego stanu zdrowia, upośledzenia czynnościowego, obniżonej jakości życia, poważnych chorób i większej śmiertelności, a skuteczne leczenie, choć trudne do osiągnięcia, przynosi wiele korzyści” (1). Konsekwencją występowania otyłości jest zwiększone ryzyko rozwoju wielu powikłań, takich jak m.in.: cukrzyca typu 2, zaburzenia lipidowe i miażdżyca, nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, zastoinowa niewydolność serca, kamica pęcherzyka żółciowego, niektóre nowotwory (piersi, endometrium, prostaty, okrężnicy), bezdech senny oraz choroba zwyrodnieniowa stawów (2).

Ewolucyjnie ludzie i ich poprzednicy musieli przetrwać okresy niedożywienia; w związku z tym presja selekcyjna najprawdopodobniej przyczyniła się do powstania genotypu sprzyjającego przejadaniu się, niskim wydatkom energetycznym i niskiej aktywności fizycznej. Ludzie, którzy mogliby wytrzymać dłuższe okresy głodu i wydajniej magazynować oraz mobilizować energię, zostali zdominowani przez ludzi bez tych adaptacji, co w konsekwencji doprowadziło do nadreprezentacji wariantów genetycznych, które sprzyjają zdolności do spożywania większych ilości pokarmu, zbyt wysokiej wartości energetycznej diety oraz większej rozbudowy tkanki tłuszczowej (3). Dopiero na przestrzeni ostatnich kilku lat przekarmienie stało się większym zagrożeniem dla zdrowia niż skutki niedożywienia (więcej osób umiera z powodu nadwagi i otyłości niż niedowagi) (4).

Biomedycy cały czas badają mechanizmy biologiczne powodujące otyłość w celu zaprojektowania interwencji mających na celu osiągnięcie i utrzymanie prawidłowej masy ciała. Te wysiłki badawcze w coraz większym stopniu poprawiają nasze zrozumienie, w jaki sposób odczucie głodu jest zaburzone u osób z otyłością, a także jak tkanka tłuszczowa, hormony jelitowe czy wątrobowe regulują apetyt i uczucie sytości w podwzgórzcu oraz jak dysfunkcja tkanki tłuszczowej powoduje wtórne problemy zdrowotne (5, 6). Kluczowa rola

pewnych regionów mózgu w regulacji masy ciała stała się oczywista dzięki obserwacjom, z których wynika, że u zwierząt ze zmianami chorobowymi i u ludzi z guzami atakującymi podwzgórze rozwijają się nieprawidłowe zachowania związane z poszukiwaniem pokarmu i otyłość (7, 8). Wraz z odkryciem, że mutacja w genie kodującym leptynę (*ob - ang. human obese gene*) (który koduje leptynę, hormon tkanki tłuszczowej) (9) powoduje poważną otyłość u myszy z otyłością (*ob/ob – ang. mouse with obesity*) (10), stało się jasne, że ośrodkowy układ nerwowy kontrolujący homeostazę energii, integruje sygnały z tkanek obwodowych, takich jak tkanka tłuszczowa (7).

Ponadto obserwacje z badań nad bliźniakami (11) sugerowały, że otyłość może być dziedzicznym zaburzeniem homeostazy energetycznej. Dziedziczność wskaźnika masy ciała (BMI – *ang. Body Mass Index*) oszacowano na 40–70% (11, 12). Rzeczywiście, odkrycie, że mutacje w genach kodujących leptynę (13, 14), receptor leptyny (15), receptor melanokortyny (16), proopiomelanokortynę (17) i inne mogą powodować ciężką otyłość u ludzi, podkreśliło znaczenie czynników biologicznych w patogenezie otyłości. Z drugiej strony, monogeniczne przyczyny otyłości są rzadkie i nie mogą wyjaśnić rozmiarów pandemii otyłości. Ponadto badania asocjacyjne całego genomu (GWAS – *ang. Genome-wide association study*) wykazały, że tylko około 2% zmienności BMI można wytłumaczyć wspólnymi polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (18, 19). Oczywiście zmiany w genetyce populacji nie mogą wyjaśnić wzrostu częstości występowania otyłości w ciągu zaledwie 40 lat.

1.2. Epidemiologia otyłości

Szacuje się, że w 2015 roku na świecie u 1,9 miliarda osób dorosłych występowała nadwaga, a 609 milionów chorowało na otyłość. Stanowiło to około 39% światowej populacji (20). W 2015 roku rozpowszechnienie nadwagi było nieco niższe u kobiet niż u mężczyzn wśród młodych dorosłych (w wieku od 20 do 44 lat), ale tendencja ta uległa odwróceniu w wieku 45-49 lat (być może zbiegając się z menopauzą u kobiet). Częstość występowania otyłości była na ogół wyższa u kobiet niż u mężczyzn we wszystkich grupach wiekowych, przy czym różnice między płciami były maksymalne między 50 a 65 rokiem życia. Wskaźniki zarówno nadwagi, jak i otyłości wzrastały wraz z wiekiem od 20 roku życia, osiągając szczyt w wieku od 50 do 65 lat, a następnie nieznacznie zmniejszały się (20).

Rozpowszechnienie nadwagi zwiększyło się z 26,5% w 1980 r. do 39% w 2015 r., co stanowi wzrost o prawie 50% w ciągu ostatnich 35 lat. Częstość występowania otyłości również zwiększyła się z 7% w 1980 r. do 12,5% w 2015 r., co stanowi wzrost o prawie 80% (20). Wskaźniki rozpowszechnienia nadwagi i otyłości były zawsze wyższe u kobiet niż u mężczyzn

w tym okresie. Wzorzec zmniejszania się różnic między płciami w ostatnich latach był widoczny w przypadku nadwagi, ale różnice między płciami w otyłości pozostały zadziwiająco stałe.

W regionie Morza Śródziemnego częstość występowania nadwagi wzrosła z 37,9% w 1980 r. do 49,6% w 2015 r., a otyłości z 11,8% w 1980 r. do 19,6% w 2015 r. W regionie afrykańskim odsetek osób z nadwagą, w latach 1980-2015, zwiększył się z 18,5% do 34,5%, a odsetek osób chorych na otyłość wzrósł z 6,2% do 12,7%. Zaobserwowano dużą zmienność między krajami we wskaźnikach rozpowszechnienia nadwagi i otyłości we wschodnich regionach śródziemnomorskich i afrykańskich np. rozpowszechnienie nadwagi w Iraku utrzymywało się raczej na stałym, ale dość wysokim poziomie (od 62,6% w 1980 r. do 65,6% w 2015 r.). Podobnie częstość występowania nadwagi w Afryce Południowej wzrosła z 49,4% w 1980 r. do 57,8% w 2015 r., podczas gdy w Etiopii zwiększyła się z 7,1% w 1980 r. do 15,9% w 2015 roku. Podobne tendencje zaobserwowano w Azji, gdzie częstość występowania nadwagi wzrosła z 10,9% w 1980 r. do 24,3% w 2015 r., a częstość występowania otyłości – z 1,7% w 1980 r. do 6,2% w 2015 r (4, 20).

Ameryka Północna oraz Południowa i Europa to kontynenty o największych odsetkach osób z nadwagą i otyłością. W obu Amerykach występowanie nadwagi zwiększyło się z 45,3% w 1980 r. do 64,2% w 2015 r., a częstość występowania otyłości wzrosła z 12,9% w 1980 r. do 28,3% w 2015 r. Stany Zjednoczone i Meksyk miały najwyższe wskaźniki rozpowszechnienia zarówno nadwagi, jak i otyłości. W regionie europejskim odsetek osób z nadwagą wzrósł z 48% w 1980 r. do 59,6% w 2015 r., a odsetek osób chorych na otyłość – z 14,5% w 1980 r. do 22,9% w 2015 r. Turcja i Stany Zjednoczone miały najwyższe wskaźniki rozpowszechnienia nadwagi i otyłości w 2015 r. odpowiednio w regionach europejskich i amerykańskich, podczas gdy Francja i Kolumbia - najniższe (20). W Polsce występowanie nadwagi w latach 1996-2019 zwiększyło się z 37,6% do 46,8% u mężczyzn oraz z 26,5% do 32,2% - u kobiet, a rozpowszechnienie otyłości wzrosło z 10,3% do 20,1% u mężczyzn oraz z 12,4% do 18,1% - u kobiet (21).

Duże zróżnicowanie w rozpowszechnieniu otyłości między krajami i wewnątrz nich odzwierciedla nie tylko różnice ekonomiczne, ale także etniczne i inne. Częstość występowania otyłości waha się od <5% w krajach takich jak Wietnam, Bangladesz, Laos i Japonia do >50% na wyspach Polinezji i Mikronezji (takich jak Nauru, Tonga i Samoa) (22) co sugeruje silne interakcje między czynnikami indywidualnymi (w tym genetycznymi) i środowiskowymi. Różnice w rozpowszechnieniu otyłości między sąsiednimi krajami można wytłumaczyć zróżnicowaniem społeczno-ekonomicznym i dużym spożyciem wysokoenergetycznej

żywności (na przykład w Jemenie (niskie dochody) częstość występowania otyłości wynosi 17,1% w porównaniu z 35,4% w Arabii Saudyjskiej (wysokie dochody) (4).

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO – *ang.* World Health Organization) definiuje nadwagę i otyłość jako nieprawidłowe lub nadmierne nagromadzenie tkanki tłuszczowej, które stanowi zagrożenie dla zdrowia (20, 23, 24). Wskaźnik masy ciała BMI, który obliczany poprzez podzielenie masy ciała w kilogramach przez wzrost w metrach podniesiony do kwadratu, jest prostym narzędziem do rozpoznawania otyłości (25). W przypadku dorosłych aktualne wytyczne Amerykańskiego Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (CDC – *ang.* Centers for Disease Control and Prevention) oraz WHO określają prawidłowy zakres BMI od 18,5 do 24,9 kg/m², podczas gdy BMI ≥ 25 kg/m² uważa się za nadwagę, a BMI ≥ 30 kg/m² klasyfikuje się jako otyłość (otyłość patologiczna rozpoznawana jest przy BMI ≥ 40 kg/m²) (26). Pomimo tej stosunkowo uproszczonej definicji, otyłość jest chorobą wieloczynnikową, która wynika z przewlekłego dodatniego bilansu energetycznego, tj. gdy podaż energii w diecie przekracza wydatek energetyczny. Nadmiar energii jest przekształcany w triglicerydy (magazynowane w tkance tłuszczowej), które powiększają się, zwiększając w ten sposób zawartość tkanki tłuszczowej i powodując przyrost masy ciała. Globalizacja systemów żywnościowych, które produkują bardziej przetworzoną i przystępną cenowo żywność oraz promują bierną nadmierną konsumpcję wysokoenergetycznej żywności, ubogiej w składniki odżywcze żywności i napojów, została zidentyfikowana jako główny czynnik napędzający epidemię otyłości (27, 28).

1.3. Typy otyłości

W populacji osób dorosłych jak i dzieci poza wieloma czynnikami będącymi przyczynami rozwoju otyłości możemy wyróżnić różne jej rodzaje. Ze względu na związek otyłości z innymi chorobami rozróżniamy otyłość pierwotną i wtórną (29).

Otyłość samoistna (pierwotna, jednoobjawowa, prosta) jest rozpoznawana w ponad 90% przypadków, zarówno wśród dzieci jak i osób dorosłych. Charakteryzuje ją brak innych objawów chorobowych. Ten typ otyłości jest spowodowany przez zaburzenie równowagi między ilością energii dostarczonej wraz z pożywieniem, a wydatkowanej przez organizm (dodatni bilans energetyczny). Może to wynikać z uwarunkowań genetycznych, jednak najważniejszą rolę odgrywają tutaj czynniki środowiskowe. Otyłość samoistna w wieku młodzieńczym bardzo często wynika ze zwolnienia szybkości wzrastania, a tym samym zmniejszenia zapotrzebowania energetycznego. W tym samym czasie apetyt dzieci jest nadal znaczny, co skutkuje u nich gromadzeniem nadmiernej ilości tkanki tłuszczowej (29).

Otyłość wtórna, inaczej patologiczna, wynika ze schorzeń endokrynologicznych, chorób układu nerwowego (mózgowe porażenie dziecięce, rdzeniowy zanik mięśni, guzy ośrodkowego układu nerwowego, stan po zapaleniu opon mózgowych i mózgu), rzadkich zespołów uwarunkowanych genetycznie, jak również może być skutkiem przewlekłego leczenia (29). Do najczęstszych przyczyn tego typu otyłości należy niedoczynność tarczycy. Powodów nieprawidłowego jej działania jest kilka:

- uszkodzenie przysadki,
- proces autoimmunologiczny (choroba Hashimoto),
- usunięcie operacyjne,
- zniszczenie radioaktywnym jodem,
- stosowanie leków (np. amidoran) (29).

Podział patogenetyczny wyodrębnia otyłość regulacyjną i metaboliczną. W tym pierwszym rodzaju otyłości pierwotnym zaburzeniem jest nadmierne łaknienie, a dopiero wtórnie występują zaburzenia dotyczące ilości i wielkości adipocytów, gromadzących nadmiar tkanki tłuszczowej. Powstaje ona pod wpływem różnych czynników, np. psychicznych, hormonalnych, ekonomicznych, gdzie następuje zaburzenie prawidłowych mechanizmów związanych z głodem i sytością, w konsekwencji czego zaburzona zostaje równowaga energii przyjmowanej i wykorzystywanej przez organizm (30). W otyłości metabolicznej pierwotne zaburzenie związane jest z genetycznym lub nabytym defektem w przemianie węglowodanów lub triglicerydów w tkance tłuszczowej, co wtórnie prowadzi do zwiększonego łaknienia (30).

Biorąc pod uwagę rozmieszczenie tkanki tłuszczowej wymienić można otyłość typu androidalnego oraz gynoidalnego, które różnią się znacznie również pod względem metabolicznym. Otyłość androidalna, inaczej trzewna, charakterystyczna jest dla płci męskiej. W tym typie otyłości nadmierna zawartość tkanki tłuszczowej zlokalizowana jest w okolicy jamy brzusznej. Osoby z otyłością androidalną są szczególnie narażone na zwiększone stężenie triglicerydów oraz cholesterolu LDL (*ang.* low-density lipoprotein) wraz ze zmniejszeniem frakcji HDL (*ang.* – high-density lipoprotein) cholesterolu w surowicy krwi. U osób z tym typem otyłości stwierdza się nadciśnienie, cukrzycę typu 2 oraz chorobę wieńcową, udary, niedokrwienie kończyn. Wzrasta u nich również ryzyko choroby zakrzepowozatorowej. Gynoidalny (pośladkowo-udowy) typ otyłości, występuje głównie u kobiet, u których tkanka tłuszczowa rozkłada się przede wszystkim na biodrach, pośladkach i udach. Ryzyko rozwoju powikłań metabolicznych w tym rodzaju otyłości jest znacznie niższe niż w przypadku otyłości brzusznej (31).

Biorąc pod uwagę inne kryteria, według których możemy sklasyfikować otyłość wyróżniamy otyłość wczesną (występującą w okresie dzieciństwa i adolescencji) i otyłość późną (rozwijającą się w okresie dorosłości). Ze względu na etiologię rozróżniamy otyłość endogenną (wywołaną czynnikami genetycznymi, metabolicznymi, chorobami ośrodkowego układu nerwowego, urazami) oraz otyłość egzogenną (spowodowaną czynnikami środowiskowymi i psychologicznymi). Biorąc pod uwagę liczbę i wielkość adipocytów możemy rozróżnić otyłość hipertroficzną (przerost adipocytów), otyłość hiperplastyczną (wzrost liczby adipocytów) oraz otyłość mieszaną (wzrost ilości i wielkości adipocytów) (32).

1.4. Genetyczne podstawy otyłości

Zmiany środowiskowe niewątpliwie przyczyniły się do szybkiego wzrostu rozpowszechnienia otyłości. Rozwój tej choroby spowodowany jest wzajemną interakcją czynników środowiskowych i wrodzonych czynników biologicznych. Co najważniejsze, istnieje silny czynnik genetyczny leżący u podstaw międzyosobniczej zmienności masy ciała, która determinuje reakcję ludzi na środowisko. Badania oszacowały, że dziedziczność otyłości wynosi od 40% do 70% (33-35). W rezultacie, badania genetyczne można wykorzystać do scharakteryzowania leżących u podstaw mechanizmów fizjologicznych i molekularnych kontrolujących masę ciała.

Klasycznie, rozważano otyłość w dwóch szerokich kategoriach. Pierwszą z nich jest tak zwana otyłość monogenowa, która jest dziedziczona według wzorca mendlowskiego. Zazwyczaj jest ona rzadka, o wczesnym początku oraz ciężka, obejmująca małe lub duże delecje chromosomalne albo pojedyncze mutacje. Drugim typem jest otyłość wielogenowa (znana również jako otyłość powszechna), będąca wynikiem setek polimorfizmów, z których każdy ma niewielki wpływ. Otyłość wielogenowa podlega wzorcowi dziedziczenia, który jest podobny do innych złożonych cech i chorób. Chociaż często uważa się, że są to dwie odrębne formy, badania genów nad otyłością monogenową i poligenową zbiegły się w tym, co wydaje się być zasadniczo podobną podstawową biologią. W szczególności ośrodkowy układ nerwowy (OUN) i szlaki neuronalne, które kontrolują przyjmowanie pokarmu, okazały się głównymi czynnikami wpływającymi na masę ciała zarówno w przypadku otyłości monogenowej, jak i wielogenowej.

Większość monogenowych mutacji otyłości zidentyfikowano w badaniach kohortowych pacjentów z otyłością ciężką i o wczesnym początku (<10 lat). Ponadto, ponieważ monogeniczna otyłość często wykazuje recesywny wzór dziedziczenia (7), pokrewieństwo w populacjach jeszcze bardziej zwiększyło szansę na zidentyfikowanie mutacji, ze względu na

większe szanse na homozygotyczność szkodliwych mutacji (36). Na przykład badania wykazały, że mutacje w genach kodujących leptynę (LEPR - *ang.* leptin receptor) i MC4R (*ang.* – melanocortin 4 receptor) wyjaśniają 30% przypadków ciężkiej otyłości u dzieci ze spokrewnionej populacji pakistańskiej (36), a defekty pojedynczego genu szerzej stanowią prawie 50% (36). Ponadto wczesne dowody wskazują, że na ekspresję mutacji powodujących otyłość monogenową może (przynajmniej częściowo) wpływać na poligeniczną podatność danej osoby na otyłość (37).

Odkrycie genów wpływających na otyłość wielogenową, która jest powszechna w populacji ogólnej, rozpoczęło się powoli od badań genów kandydujących i badań powiązań w całym genomie. Podejście oparte na genach kandydujących zostało po raz pierwszy zastosowane w połowie lat 90. XX wieku i miało na celu walidację genów zidentyfikowanych za pomocą ludzkich i zwierzęcych modeli skrajnej otyłości pod kątem roli w powszechnej otyłości. Typowe warianty takich genów kandydujących przetestowano pod kątem związku z ryzykiem otyłości, BMI lub innymi cechami składu ciała. W ciągu kolejnych 15 lat badano setki genów jako kandydatów, ale warianty tylko w sześciu (ADRB3, BDNF36, CNR1, MC4R38, PCSK1 i PPARG40) wykazały powtarzalne powiązanie ze skutkami otyłości (35, 38). Podejście polegające na powiązaniu całego genomu pojawiło się w tej dziedzinie pod koniec lat 90. Badania powiązań całego genomu opierają się na pokrewieństwie osobników i sprawdzają, czy określone regiony chromosomów korelują z chorobą lub cechą przez pokolenia. Mimo, że w ponad 80 badaniach powiązań obejmujących cały genom zidentyfikowano >300 loci chromosomalnych z sugestywnymi dowodami powiązania z cechami otyłości, niewiele loci zostało zreplikowanych i żadne nie zostało z powodzeniem zmapowane w celu wskazania genu lub genów przyczynowych (39). Ostatecznie badania powiązań genów kandydujących i całego genomu, ograniczone przez małe rozmiary próbek, rzadkie pokrycie zmienności genetycznej w całym genomie i brak replikacji, miały jedynie marginalny wpływ na postęp w odkrywaniu genów powodujących powszechne skutki otyłości. Podejścia stosowane do identyfikacji genów powiązanych z otyłością zależą od formy otyłości i technologii genotypowania dostępnej w danym czasie. Wczesne badania odkrywania genów dla monogenicznych postaci otyłości miały projekt skoncentrowany na przypadku: pacjentów z ciężką otyłością wraz z członkami ich rodzin dotkniętych chorobą. Natomiast zdrowych pacjentów zbadano pod kątem potencjalnych mutacji przyczynowych powodujących zaburzenia genów za pomocą sekwencjonowania Sangera. Natomiast zmienność genetyczna związana z powszechnymi formami otyłości została zidentyfikowana w badaniach populacyjnych na dużą skalę albo przy użyciu projektu kontroli przypadku lub ciągłych cech,

takich jak BMI. Odkrycie genów dla obu form otyłości było początkowo oparte na hipotezach; to znaczy ograniczone do zestawu genów kandydujących, które, jak sugerują dowody, odgrywają rolę w regulacji masy ciała. Jednak w ciągu ostatnich dwóch dekad postęp w wysokowydajnych technologiach genotypowania i sekwencjonowania całego genomu, w połączeniu ze szczegółową wiedzą na temat architektury genetycznej człowieka, umożliwił badanie wariantów genetycznych w całym genomie pod kątem ich roli w masie ciała regulacji przy użyciu podejścia generującego hipotezy.

Tempo odkrywania genów dla otyłości przyspieszyło wraz z pojawieniem się genomowych badań asocjacyjnych (35). Pierwsze GWAS dla cech otyłości zostały opublikowane w 2007 roku i zidentyfikowały klaster powszechnych wariantów w pierwszym intronie locus genu FTO, który był powiązany z BMI (40). Następnie badania przyspieszyły i do tej pory, dzięki GWAS, zidentyfikowało ponad 1100 niezależnych loci związanych z szeregiem cech otyłości (41). Badania GWAS zwykle koncentrowały się na biallelicznej, wspólnej zmienności genetycznej, ale były również wykorzystywane do badań przesiewowych pod kątem roli wariantów liczby kopii DNA (CNV - *ang.* copy number variation) w otyłości. Jak dotąd zidentyfikowano tylko kilka CNV, które mają istotny związek z BMI, takie jak delecja 1p31.1 45 kb w pobliżu genu NEGR1 (*ang.* - neuronal growth regulator 1) (42), która koduje cząsteczkę adhezji komórkowej wyrażaną w mózgu (43); delecja 16p12.3 21-kb przed genem GPRC5B70 (*ang.* - G protein-coupled receptor class c group 5 member B), która może modulować wydzielanie insuliny (44); 10q11.22 CNV w genie receptora 1 polipeptydu trzustki (PPYR1 – *ang.* pancreatic polypeptide receptor 1; znany również jako NPY4R) (45), kodujący silną substancję zmniejszającą ryzyko wystąpienia otyłości, o którym wiadomo, że hamuje przyjmowanie pokarmu (46) oraz wieloallelowy CNV 1p21.1 obejmujący gen kodujący alfa-amylazę 1 (47), który wytwarza α -amylazę ślinową, kluczowy enzym w trawieniu skrobi (48). Oprócz otyłości monogenowej oraz poligenowej, wśród podstaw genetycznych wyróżnia się również otyłość będącą elementem zespołu. Otyłość będąca elementem zespołu jest to otyłość występująca w skojarzeniu z innymi zaburzeniami metabolicznymi o podłożu genetycznym w obrębie jednego fenotypu. Zaburzenia te mogą mieć tło genetyczne, jak również mogą wynikać z uszkodzenia więcej niż jednego genu. Zespoły genetyczne, którym towarzyszy otyłość występują rzadko. Nie można jednak o nich zapomnieć, gdyż prawidłowo postawiona diagnoza może w dużym stopniu ułatwić prowadzenie kompleksowej terapii. Przykładem takiego zespołu jest Zespół Prader-Willi (PWS – *ang.* Prader-Willi syndrome), który jest najczęstszym genetycznym zaburzeniem związanym z otyłością. Choroba ta występuje zarówno u mężczyzn, jak i kobiet, niezależnie od rasy, a jej częstość występowania wynosi

przybliżenie 1 na 25 000 urodzeń. Objawy kliniczne zespołu Prader-Willi są dość niespecyficzne, a cechy dysmorfii twarzy mogą być subtelne, co często utrudnia wcześniejsze rozpoznanie tej choroby. To z kolei może prowadzić do niedoszacowania faktycznej częstości jej występowania. U osób z zespołem Prader-Willi otyłość wynika z obniżonego o około 14% całkowitego zapotrzebowania energetycznego, mimo że mają one duży apetyt, podobnie jak osoby z niedoborem leptyny. Oprócz otyłości, w tym zespole występuje również niepełnosprawność intelektualna, zachowania kompulsywne oraz problemy ze snem. Chorzy na zespół Prader-Willi często rozwijają również cukrzycę typu 2 oraz mają zaburzenia w gospodarce lipidowej (49). W przypadku tego zespołu występuje również upośledzenie intelektualne, zachowania kompulsywne oraz problemy ze snem. Dodatkowo, u pacjentów z tym zespołem często występuje szybko rozwijająca się cukrzyca typu 2 oraz zaburzenia w gospodarce lipidowej. (50). Kolejnym przykładem takiego zespołu jest Zespół Bardet-Biedl (BBS – *ang.* Bardet-Biedl syndrome). Występowanie tego zespołu szacuje się na około 1 na 175 000 osób w krajach Europy Zachodniej, a w niektórych populacjach, takich jak Izraelcy Beduini i mieszkańcy Puerto Rico, nawet na 1 na 100 000 osób (51). Otyłość jest powszechnym i trudnym do leczenia objawem występującym już we wczesnym dzieciństwie w przypadku zespołu BBS. Wielokrotnie okazuje się, że terapia dietetyczna ma niewielką skuteczność w tym przypadku (51). Jeszcze innym jest Zespół Alströma (AS – *ang.* Alström syndrome). Syndrom ten został opisany u ponad 300 pacjentów. Rozpoznanie zespołu AS może być trudne ze względu na znaczną różnicowanie objawów klinicznych oraz podobieństwo do innych genetycznych zespołów charakteryzujących się otyłością. Otyłość często występuje już w dzieciństwie u osób z tym zespołem. Jednym z możliwych czynników przyczyniających się do otyłości jest wzmożony apetyt. Jednak u pacjentów z AS nadmierna masa ciała ma tendencję do ustępowania po osiągnięciu 20 roku życia (52). W przypadku chorych na AS pacjentów, oprócz otyłości, występuje degeneracja siatkówki oraz głuchota. Często obserwuje się również problemy z płodnością - u mężczyzn może występować astenozoospermia, a u kobiet zaobserwować przedwczesne *adrenarche*, obecność policystycznych jajników oraz zaburzenia owulacji. (53). Bardzo rzadko występującym zespołem genetycznym jest Zespół Cohen (CS – *ang.* Cohen syndrome). Dotychczas nie udało oszacować się częstości jego występowania, a Pierwszy opis CS dokonany został przez Cohen'a et al. w 1973 r (54). Dotyczył on trójki dzieci z czego dwójka stanowiła rodzeństwo. U tych dzieci obserwowano różne objawy, w tym charakterystyczne cechy dysmorficzne twarzy, opóźniony rozwój psychiczny, hipotonię w okresie niemowlęcym, nadmierną elastyczność stawów oraz otyłość występującą we wczesnym dzieciństwie.(54). Większość osób z zespołem Cohen'a urodzona jest z niską masą

ciała, nawet jeśli przebieg ciąży był prawidłowy. Dodatkowo, w okresie noworodkowym często występują trudności z karmieniem u tych pacjentów. Otyłość u osób z zespołem Cohen'a pojawia się zazwyczaj w wieku około 8-10 lat. W przeciwieństwie do wcześniejszych przekonań, otyłość nie zawsze towarzyszy tej chorobie. Jeśli jednak występuje, największe nagromadzenie tkanki tłuszczowej można zaobserwować w okolicy tułowia, brzucha oraz twarzy (55).

1.4.1. MT-ATP6 – gen mitochondrialny łączony z otyłością

Okrągły mitochondrialny DNA (mtDNA) zawiera 16 569 par zasad (pz). Komórki somatyczne zwykle zawierają około 1000 do 10 000 cząsteczek mtDNA (Falkenberg et al. 2007 D2). mtDNA koduje 37 genów, z których 13 to podjednostki kodujące białka systemu fosforylacji oksydacyjnej (56). Ponadto mtDNA składa się z niekodującego regionu kontrolnego o długości 1100 pz, znanego jako pętla przemieszczenia mitochondrialnego D. Pętla D składa się z dwóch do trzech hiperzmiennych części. Zarówno transkrypcja, jak i replikacja są koordynowane w pętli D (57).

W literaturze zdecydowana większość badań koncentruje się na genomie jądrowym w celu oceny molekularnych genetycznych podstaw otyłości. Do tej pory stwierdzono, że kilka genów jest powiązanych z otyłością, w tym gen leptyny na chromosomie 7 q, gen receptora leptyny na 1 p, gen proopiomelanokortyny na 2 p, receptor melanokortyny 4 gen na 18 q, gen receptora melanokortyny 3 na 20 q, gen konwertazy prohormonu 1 na 5 q, gen receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma 2 (PPAR γ 2 – *ang.* peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2) na chromosomie 3 p, gen FTO związany z otyłością na chromosomie 16 q 12.2 i gen Niemann-Picka C1 na chromosomie 18 q 11.2 (39). Oprócz genów jądrowych, zmiany genomu mitochondrialnego zostały również ocenione w przypadku otyłości, ponieważ mitochondria odgrywają ważną rolę w przemianach energetycznych.

Wśród wielu czynników, które się przyczyniają do rozwoju otyłości, uważa się, że zmieniona funkcja i zawartość mitochondriów odgrywa przyczynową rolę w zespole metabolicznym, ponieważ zarówno wadliwa fosforylacja oksydacyjna, jak i zmieniona biogeneza mitochondriów mogą być zaangażowane w gromadzenie się trzewnej tkanki tłuszczowej i rozwój insulinooporności (58). Badania wykazały rolę zależnych od wieku zmian w poziomach mitochondrialnego DNA i ogólnej integralności oraz zwiększonych poziomów stresu oksydacyjnego i peroksydacji lipidów w procesie starzenia się człowieka (59). Wykorzystując zarówno ludzkie komórki, jak i tkanki, wyniki badań Lee i in. (60) wykazały również, że endogenne i egzogenne stres oksydacyjny może indukować uszkodzenie mitochondrialnego DNA (zwiększone delecje na dużą skalę), jak również skutkować zarówno

zwiększoną zawartością mtDNA, jak i ogólną masą mitochondriów. Ponadto kilka badań udokumentowało rolę zwiększonego mitochondrialnego DNA w otyłości u ludzi i lipogenezie w tkance tłuszczowej (61). Co więcej, modele zwierzęce zostały również wykorzystane do wykazania, że dieta może prowadzić do uderzających zmian w zawartości mitochondriów w różnych tkankach (62, 63).

Związek między mtDNA, otyłością, zaburzeniami i chorobami współistniejącymi u ludzi wydaje się mniej jasny. Stwierdzono, że obniżony poziom mtDNA w komórkach krwi obwodowej jest związany z zespołem metabolicznym i insulinooporności u dorosłych i sugeruje się, że poprzedza rozwój cukrzycy typu 2 (64). Natomiast zwiększone stężenie mtDNA we krwi obwodowej odnotowano u pacjentów z cukrzycą typu 2 (65) oraz u pacjentów z nefropatią cukrzycową (66).

Ponadto dysfunkcje mitochondriów, skutkują akumulacją lipidów oraz rozwinięciem insulinooporności (67). Zbadano kilka wariantów mtDNA w różnych populacjach ze zmianami związanymi z otyłością i metabolizmem lipidów (68) i zasugerowano, że poszczególne haplogrupy mtDNA mogą być związane z nieefektywnym wydatkiem energetycznym (69). Białko mitochondrialnej ATPazy 6 (MT-ATP6 – *ang.* mitochondrially encoded ATP synthase membrane subunit 6) kodowane przez genom mitochondrialny jest składnikiem dużego enzymu zwanego syntazą ATP, który katalizuje końcowy etap fosforylacji oksydacyjnej (70). Ponieważ gen mt-ATP6 wpływa na produkcję adenylotrifosforanów (ATP – *ang.* adenosine triphosphate) w komórce, może to być związane z otyłością. Z drugiej strony mitochondrialny łańcuch przenoszenia elektronów składa się z 4 kompleksów enzymatycznych (I, II, III i IV). Trzy z tych kompleksów (I, III i IV) zawierają podjednostki kodowane przez mitochondrialne DNA (71).

Do tej pory wykryto kilka polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP – *ang.* single nucleotide polymorphism) zarówno w genach MT-ATP6, jak i cytochromu B (CytB – *ang.* cytochrome B) i wszystkie zostały zgłoszone w bazie danych ludzkiego mtDNA (MITOMAP). Wiadomo, że substytucje synonimiczne to ciche zmiany w genomie, które nie powodują żadnych istotnych zmian w białku. Jednak te substytucje mogą mieć negatywny wpływ na dokładność, wydajność i szybkość ekspresji genów. Kodony powstałe w wyniku podstawienia nukleotydów mogą również powodować niedobór białka. Z drugiej strony uważa się, że niesynonimiczne SNP, które powodują zmiany kodowanych aminokwasów, mają duży wpływ na funkcje białek (72).

1.4.2. Gen SCD i jego rola w otyłości

Nadmiar węglowodanów w diecie jest przekształcany w tłuszcz głównie w wątrobie i tkance tłuszczowej. Nadmiar glukozy lub fruktozy jest metabolizowany do pirogronianu poprzez glikolizę, a następnie do acetylo-koenzymu A (CoA – *ang.* coenzyme A), który służy jako substrat do reakcji karboksylacji katalizowanej przez karboksylazę acetylo-CoA (ACC – coenzyme A carboxylase) (73). Karboksylacja acetylo-CoA jest ściśle regulowaną reakcją syntetyzującą malonylo-CoA, który hamuje utlenianie kwasów tłuszczowych (FA – *ang.* fatty acids) i służy jako substrat do biosyntezy FA (55). Octany i aminokwasy również są wykorzystywane jako substraty do lipogenezy. Zsyntetyzowane nasycone kwasy tłuszczowe (SFA – *ang.* saturated fatty acids) i jednonienasycone kwasy tłuszczowe (MUFA – *ang.* monounsaturated fatty acid) są włączane do różnych rodzajów lipidów, w tym triglicerydów (TG – *ang.* triglycerides) i fosfolipidów. Lipidy syntetyzowane w wątrobie są kumulowane jako lipoproteiny o bardzo małej gęstości i dostarczane do tkanki tłuszczowej w celu ich przechowywania (55). Proces lipogenezy jest modulowany przez kilka czynników, w tym czynniki dietetyczne i hormonalne, które kontrolują ekspresję enzymów lipogenicznych i dostarczają substraty do biosyntezy FA. Lipogeneza jest regulowana przez kluczowe czynniki transkrypcyjne, w tym receptor wątroby X (LXR – *ang.* liver X receptor), białko wiążące element regulujący sterol-1c (SREBP-1c – *ang.* sterol regulatory element-binding protein 1) i białko wiążące element odpowiedzi na węglowodany (CHREBP – *ang.* Carbohydrate response element binding protein). LXR i SREBP-1c odgrywają ważną rolę w regulacji lipogenezy w odpowiedzi na insulinę, podczas gdy CHREBP pośredniczy w lipogenezie indukowanej glukozą (74, 75). Oprócz regulacji transkrypcji, niektóre enzymy lipogeniczne i czynniki transkrypcyjne są również modulowane przez modyfikacje kowalencyjne i hamowanie sprzężenia zwrotnego. Na przykład fosforylacja ACC przez kinazę białkową aktywowaną przez AMP (AMPK – *ang.* 5'AMP-activated protein kinase) hamuje aktywność ACC i prowadzi do większego utleniania FA (76). AMPK fosforyluje również SREBP-1c, ograniczając jego translokację jądrową (77). Palmitynian i oleinian zmniejszają aktywność ACC (78).

Desaturaza stearylo-CoA (SCD – *ang.* stearyl-CoA desaturase) jest centralnym enzymem lipogennym, który stanowi potencjalny cel kontroli lipogenezy. Jest integralnym białkiem zakotwiczonym w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER – *ang.* endoplasmic reticulum) i katalizuje syntezę MUFA, głównie oleinianu i palmitoleinianu, odpowiednio z SFA, palmitynianu i stearynianu. Osiąga się to przez wprowadzenie podwójnego wiązania cis między atomami węgla 9 i 10 substratu acylo-CoA. Oprócz tlenu cząsteczkowego reakcja

SCD1 wymaga nikotynamidoadeninodinuokleotydu fosforanowego (NAD(P)H - *ang.* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), reduktazy cytochromu b5, przez które elektrony przepływają do SCD, a następnie do cząsteczkowego tlenu, który jest redukowany do wody.

Białko SCD1 powoduje przekształcenie SFA do MUFA, które są preferencyjnie włączane do głównych rodzajów lipidów, takich jak TG, estry cholesterolu i fosfolipidy w tkance tłuszczowej oraz w wątrobie (79). Oleinian jest głównym produktem SCD1 i zawiera prawie 45% wolnych kwasów tłuszczowych (FFA – *ang.* free fatty acids) w ludzkiej tkance tłuszczowej (80). Oprócz funkcji strukturalnych MUFA pełnią funkcje sygnalizacyjne i mogą regulować metabolizm ogólnoustrojowy oraz modulować rozwój chorób metabolicznych. Podwyższone stężenie MUFA w modelach zwierzęcych, jak również w przypadku ludzi, wskazuje na znaczącą rolę SCD1 w rozwoju zaburzeń metabolicznych, tj. insulinooporności i hiperlipidemii oraz przewlekłych chorób metabolicznych, związanych z otyłością np. niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (81). Ponadto badania na modelach myszy transgenicznych wykazały istotną rolę SCD1 w regulacji procesów komórkowych, w tym syntezy i utleniania lipidów, termogenezy, sygnalizacji hormonalnej i stanu zapalnego (79).

1.4.3. SCD1 w metabolizmie wątroby

Chociaż izoformy SCD wykazują względne podobieństwa w sekwencjach aminokwasowych i zsyntetyzowanych produktach, ulegają one różnej ekspresji w tkankach ciała, a usunięcie poszczególnych izoform z określonych tkanek wykazuje różne fenotypy. Na przykład myszy SCD1 LKO wykazują różne fenotypy w porównaniu z myszami SCD1 SKO, co sugeruje, że produkty SCD1, czyli MUFA, pełnią różne funkcje w tkankach. Alternatywnie, niedobór MUFA w różnych tkankach może prowadzić do mechanizmów kompensacyjnych, które mogą pomóc wyjaśnić fenotypy obserwowane u tych myszy. Niedobór SCD1 jest związany ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju zaburzeń metabolicznych, indukowanych przez SFA. Dodatkowo zapobiega wystąpieniu stłuszczenia wątroby, co sugeruje, że MUFA przyczyniają się do przyrostu masy ciała a obniżone stężenia MUFA ograniczają gromadzenie się tłuszczu w wątrobie (75). Myszy SCD1 GKO wykazywały również zwiększenie wykorzystania glukozy w mięśniach szkieletowych i sercu, które wystąpiło wraz ze zwiększoną sygnalizacją insuliny w tych tkankach (82, 83). Niedobór SCD1 w wątrobie spowodował znaczne zmniejszenie ekspresji genów lipogenicznych oraz spowolnienie procesu lipogenezy *de novo*, związanej ze zmniejszonym wydzielaniem TG w wątrobie. Aby dodatkowo określić, czy redukcja MUFA lub akumulacja SFA wpływa na zmniejszenie masy ciała i lipogenezę w wątrobie, myszy LKO karmiono dietą wysokowęglowodanową (HCD – *ang.* high

carbohydrate diet) z dodatkiem trioleiny lub tristearyny. HCD uzupełniony trioleiną, ale nie tristearyną, przywrócił zmniejszoną ekspresję wątrobowych genów lipogenicznych oraz wpłynął na wzrost masy ciała u myszy LKO. Egzogenny oleinian normalizował również akumulację i wydzielanie TG w wątrobie, które pozostawały znacznie zmniejszone u myszy LKO karmionych tristearyną. Co więcej, myszy LKO są bardziej wrażliwe na insulinę i wykazywały obniżone stężenie glukozy we krwi po 4-godzinnym głodzeniu w porównaniu z myszami kontrolnymi (84, 85). Ta zmiana stężenia glukozy we krwi jest prawdopodobnie związana ze zmniejszoną syntezą glikogenu w wątrobie i glukoneogenezą u myszy LKO, co zostało skorygowane po karmieniu HCD z dodatkiem trioleiny, ale bez dodatku tristearyny. Niepowodzenie niedoboru wątrobowego SCD1 w zmniejszaniu masy ciała u myszy karmionych dietą bogatotłuszczową (HFD – *ang.* high fat diet), doprowadziło do założenia, że ochrona przed rozwojem otyłości indukowanej przez HFD wymaga inaktywacji SCD1 zarówno w wątrobie, jak i w białej tkance tłuszczowej (WAT – *ang.* white adipose tissue). Kolejne badanie wykazało, że połączona delecja SCD1 z obu tkanek nie chroniła myszy przed otyłością wywołaną przez HFD (86). Przypuszczano, że zmniejszona aktywność SCD1 w obu tkankach nie była wystarczająca do wywołania fenotypów hipermetabolizmu i zwiększonego wydatku energetycznego, istotnych dla ochrony przed nadmierną masą ciała wywołaną HFD, dlatego oporność na przyrost masy ciała wywołany dietą HFD i stłuszczenie wątroby wymaga niedoboru SCD1 w tkance pozawątrobowej (75).

Zgodnie z tą ideą myszy SKO wykazywały ochronę przed otyłością wywołaną HFD wraz ze zwiększonym wydatkiem energetycznym, który powinien być wystarczający do przeciwdziałania zwiększonej podaży kilokalorii związanej z karmieniem HFD (87). Ponadto, podobnie jak myszy SCD1 GKO, myszy SKO utrzymywały szczupły fenotyp, któremu towarzyszyła ochrona przed przedłużoną opornością na insulinę wywołaną karmieniem HFD. Myszy SKO wykazywały zwiększoną wrażliwość na zimno i umierały w ciągu 3 godzin od ekspozycji na zimno z powodu hipoglikemii. Wrażliwość na zimno i wynikająca z tego niezdolność do utrzymania prawidłowego stężenia glukozy we krwi uległy znacznej poprawie po karmieniu HFD w porównaniu z karmą normalną.

Wpływ SCD1 na FA i modulację transportu glukozy podczas ćwiczeń badano na modelach zwierzęcych i ludziach. Wykazano, że zwiększenie aktywności SCD1 poprzez czynniki dietetyczne lub ćwiczenia może chronić przed nadmiernym przyrostem masy ciała i cukrzycą typu 2 (88). Wcześniej zaobserwowano, że nadekspresja SCD1 hamowała stan zapalny i odpowiedź na stres retikulum endoplazmatycznego po ekspozycji na palmitynian (88). Dobrzyń i in. (89) zaobserwowali, że trening wytrzymałościowy przez 6 tygodni

skutkował zwiększoną ekspresją SCD1 przy jednoczesnym podwyższonym stężeniu diacylogliceroli i TG szczurów szczepu Wistar (89). Wywnioskowano, że podwyższony SCD1 jest ważny dla syntezy TG i odpowiedzi adaptacyjnej mięśni oksydacyjnych narażonych na długotrwały wysiłek fizyczny(89). Wykazano wcześniej, że zwiększona aktywność SCD1 poprawiła metabolizm i zwiększyła wydolność wysiłkową u myszy z nadekspresją SCD1 specyficznych dla mięśni (88). Podwyższona zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych u tych zwierząt była związana ze zwiększonym utlenianiem FA i ilością mRNA transportera glukozy 1 (GLUT1 – *ang.* glucose transporter 1) oraz obniżonym stężeniem glukozy w osoczu na czczo (88). Biorąc pod uwagę fakt, że w tych badaniach zaobserwowano wzrosty poziomów PPAR α , nie jest wykluczone, że zwiększona dostępność potencjalnych ligandów dla receptora i jego późniejsza aktywacja może być głównym mechanizmem poprawy funkcji metabolicznych u tych zwierząt (88).

W przeciwieństwie do zwiększonego utleniania FA obserwowanego w mięśniach szkieletowych i wątrobie myszy SCD1 GKO, niedobór SCD1 zwiększa transport glukozy przy zmniejszonym wychwycie FA i utlenianiu w sercu. Przejście z wykorzystywania FA na substrat glukozowy było związane z podwyższoną sygnalizacją insuliny, zmniejszonym transportem i dostępnością FA oraz stłumioną ekspresją genów utleniania FA u myszy SCD1 GKO (83). Używając mysiego modelu SCD1 KO (*ob/ob*; SCD1KO) z niedoborem leptyny, wykazano, że brak SCD1 poprawia czynność serca poprzez poprawę dysfunkcji skurczowej i rozkurczowej. Spadek akumulacji lipidów i zahamowanie apoptozy zostały wymienione jako główne czynniki związane z obserwowaną poprawą funkcji serca u tych zwierząt (89). Bednarski i in. (90) wykazali, że niedobór SCD1 był związany ze zmniejszoną zawartością lipidów w sercu i aktywacją lipolizy, niezależnie od receptora a aktywowanego przez proliferatory peroksydomów, ważnego regulatora utleniania FA w mięśniach.

Pomimo dowodów sugerujących, że brak ekspresji SCD1 może wywierać efekt ochronny poprzez zmniejszenie gromadzenia się tkanki tłuszczowej, niektóre badania wskazują, że indukcja SCD1 może być korzystna dla metabolizmu energetycznego mięśnia sercowego (91). Serce szczurów z otyłością utrzymywanych na diecie bogatej w sacharozę przez 3 miesiące wykazywało silny wzrost SCD1 bez jakichkolwiek zmian w lipogenezie. Badania *in vitro* wykazały, że SCD1 zwiększa akumulację lipidów indukowaną palmitynianem, ale hamuje utlenianie FA, syntezę ceramidu, aktywację kaspazy 3 i wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Ponadto SCD1 hamuje utlenianie FA i chroni przed apoptozą poprzez represję aktywności AMPK. Jednak w obecności nadmiernych bodźców odżywczych i uporczywego stresu oksydacyjnego, SCD1 jest inhibowany wraz z późniejszym wzrostem utleniania FA,

indukcją apoptozy i kardiomiopatią (91). Łącznie badania te wskazują, że SCD1 ma kluczowe znaczenie w regulacji metabolizmu w sercu i mięśniach szkieletowych, a zmniejszenie aktywności SCD1 w tych tkankach może prowadzić do różnych fenotypów.

1.5. Rodzaje tkanki tłuszczowej

1.5.1. Biała tkanka tłuszczowa (WAT)

Biała tkanka tłuszczowa (WAT – *ang.* white adipose tissue) nazwę zawdzięcza swojej barwie, która jest widoczna podczas oglądania bez powiększenia. Zbudowana jest z adipocytów z pojedynczą kroplą tłuszczu w cytoplazmie. Adipocyty te charakteryzują się dużą wakuolą lipidową, która wypełnia większość komórki. Jądro jest zepchnięte do boku, blisko błony komórkowej, a cytoplazma tworzy niewielki pierścień wokół wakuoli (92).

Tkanka wydzielnicza WAT ma kilka niezwykłych cech. W przeciwieństwie do innych narządów wydzielniczych charakteryzuje się określoną lokalizacją. Nie tworzy jednolitej struktury i specyficznej lokalizacji, mimo że wyróżnia się dwa główne rodzaje tkanki tłuszczowej: podskórną (SAT – *ang.* subcutaneous adipose tissue) i trzewną (VAT – *ang.* visceral adipose tissue). Różnią się one aktywnością metaboliczną i zdolnością do wydzielania adipokin, jak i również wykazują zróżnicowanie strukturalne. Podskórne adipocyty są duże i mniej aktywne metabolicznie, a trzewne są małe i bardziej aktywne. SAT to największy rezerwuar tłuszczu w organizmie (około 65-70%). U kobiet przeważa tkanka podskórna zlokalizowana głównie w okolicy pośladkowo-udowej, a nie w okolicy brzucha, jak u mężczyzn. Najniższą aktywnością charakteryzuje się tkanka tłuszczowa podskórna w okolicy pośladkowo-udowej (93). Tkanka tłuszczowa w jamie brzusznej, zlokalizowana pod brzuszными obszarami tkanki trzewnej, jest najbardziej aktywna lipolitycznie zarówno u mężczyzn, jak u kobiet. Wśród kilkudziesięciu substancji czynnych wytwarzanych przez adipocyty znajdują się związki o różnych rolach biologicznych. Nadmierna zawartość tkanki tłuszczowej negatywnie wpływa na ich wydzielanie, powodując rozwój wielu zaburzeń, przyczyniających się do pojawienia lub nasilenia objawów chorobowych (94). Dużo bardziej negatywny wpływ tkanki trzewnej na zdrowie wynika z jej wysokiej aktywności lipolitycznej i uwalniania dużych ilości kwasów tłuszczowych, zwiększonego uwalniania substratów do glukoneogenezy w wątrobie, glicerolu, adipokin oraz pobudzenia produkcji lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL - *ang.* very low-density lipoprotein), TG i apolipoproteiny B. Nadmierne wydzielanie kwasów tłuszczowych powoduje wzrost ich stężenia we krwi i odkładanie się m.in. w mięśniach, gdzie zaburzają transmisję wewnątrzkomórkową, zakłócają sygnały insuliny powodując rozwój lipotoksyczności i insulinooporności (95).

Tkanka tłuszczowa ludzi z otyłością charakteryzuje się stanem zapalnym z postępującym naciekiem komórek odpornościowych. Komórki układu odpornościowego są stymulowane przez FA do uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworów α (TNF α – *ang.* tumor necrosis factor) i interleukina-1 β (IL-1 β – *ang.* interleukin 1), które z kolei aktywują lipolizę w adipocytach (96). Nadmierna lipoliza w tkance tłuszczowej zwiększa ogólnoustrojową dostępność lipidów, które powodują insulinooporność w odległych tkankach (97). U ludzi z insulinoopornością nadmierna lipoliza w tkance tłuszczowej nie tylko stymuluje uwalnianie glicerolu i FA, ale także modyfikuje wydzielanie cytokin. Sygnały te sprzyjają ektopowej akumulacji lipidów i stanom zapalnym o niskim stopniu nasilenia, co prowadzi do oporności na insulinę w wątrobie i mięśniach szkieletowych. Mimo, że liczne modele zwierzęce pokazują poprawę wrażliwości na insulinę w stanach niedoboru lipazy hormonowrażliwej (HSL – *ang.* *ang.* hormone-sensitive lipase) i lipazy triglicerydowej tłuszczowej (ATGL – *ang.* adipose triglyceride lipase) (97, 98), które zmniejszają lipolizę, to jednak ostatnie dowody u ludzi kwestionują związek między insulinoopornością całego organizmu a zwiększoną lipolizą w tkance tłuszczowej (98).

1.5.2. Brązowa tkanka tłuszczowa

Wielokomórkowe adipocyty tworzą tkankę tłuszczową o brązowej barwie – brązową tkankę tłuszczową (BAT – *ang.* brown adipose tissue). Anatomiczne różnice między białymi i brązowymi adipocytami w pełni wyjaśniają ich odmienną funkcję. Białe adipocyty magazynują energię, aby umożliwić przerwę między posiłkami. Jeszcze około 100 lat temu poszukiwanie pożywienia wymagało tygodniowych odstępów między posiłkami, a w tym okresie WAT warunkowała przeżycie, a więc główną funkcją białej tkanki tłuszczowej była dystrybucja składników odżywczych do organizmu w celu przeżycia jednostki (92). Warto zauważyć, że białe adipocyty wytwarzają leptynę i asprozynę (99), hormony działające na ośrodek sytości i głodu w OUN i są zdolne do wpływania na zachowanie ssaków w zakresie poszukiwania i przyjmowania pokarmu.

Brązowe adipocyty rozkładają lipidy, aby wytworzyć ciepło. Rozmieszczenie lipidów zwiększa wykładniczo liczbę kwasów tłuszczowych, które mogą wejść do beta-oksydacji. Unikalna obecność białka rozprzegającego (UCP1 – *ang.* uncouple protein) w mitochondriach brązowych adipocytów wyjaśnia produkcję ciepła (100). W rzeczywistości ciepło jest nieuniknionym produktem ubocznym niezwiązanej fosforylacji oksydacyjnej, ponieważ substrat zawiera łańcuchy oddechowe w mitochondriach brązowych adipocytów. Zatem, produkcja ciepła jest istotna i umożliwia ssakom przetrwanie w zimnym środowisku. Brązowe adipocyty są aktywowane przez wystawienie na zimno i przyjmowanie pokarmu. Za aktywację

czynnościową odpowiedzialny jest współczulny układ nerwowy poprzez mięszkowe włókna nerwowe zakończone wielokrotnymi ekspansjami bezpośrednio na błonie brązowych adipocytów. Noradrenalina aktywuje brązowe adipocyty działając na dość specyficzne receptory B3 adrenergiczne. Rozszerzona sieć naczyń włosowatych (około sześć razy więcej niż w WAT) może zaspokoić podwójną potrzebę tlenu do wysokich procesów oksydacyjnych brązowych adipocytów oraz szybkiego usuwania i dystrybucji ciepła do reszty ciała. Zatem WAT i BAT różnią się również pod względem dystrybucji nerwów naczyniowych i mięszkowych, która jest znacznie wyższa w BAT. Ponadto brązowe adipocyty wykazują się również działaniem endokrynnym, parakrynnym i autokrynnym (95).

1.5.3. Beżowa tkanka tłuszczowa

WAT i BAT są zorganizowane w celu utworzenia dużej struktury, złożonej z rezerwuarów zlokalizowanych w magazynach podskórnych i trzewnych. Szczegółowe analizy histologiczne wykazały, że zarówno magazyny podskórne, jak i trzewne zawierają obszary WAT i BAT z kilkoma regionami, w których mieszą się białe i brązowe adipocyty (101). Większość BAT znajduje się w przedniej/górnej części ciała, w podskórnej tkance tłuszczowej (zarówno w klatce piersiowej, jak i brzuchu) w tkance tłuszczowej trzewnej. Względna ilość WAT i BAT zależy od kilku czynników: wieku (zawartość BAT zmniejsza się wraz z wiekiem), podłoża genetycznego (myszy podatne na otyłość mają mniej BAT), stosunku objętości ciała do powierzchni (v/s) (myszy mają wyższy stosunek v/s niż ludzie, stąd wyższa termodypersja i większe zapotrzebowanie na BAT), warunków środowiskowych (zwierzęta narażone na zimno mają większą zawartość BAT), warunków żywieniowych (chude myszy mają więcej BAT niż te z otyłością) oraz płci (samice mają więcej BAT niż dominujące samce) (102). Badania wyjaśniają skład tkanki tłuszczowej oraz to, że WAT i BAT współdziałają w celu uzyskania tej samej roli. Badania pokazały, że główną funkcją tkanki tłuszczowej wydaje się podział energii pochodzącej ze składników odżywczych na dwa różne szlaki: WAT do metabolizmu i BAT do termogenezy, ale dane ukazują, że obie tkanki są w stanie odwracalnie przekształcić się w drugą, dzięki czemu, podczas chronicznego narażenia na zimno WAT transróżnicuje się do BAT, a podczas przewlekłego dodatniego bilansu energetycznego BAT transróżnicuje się do WAT (92, 101). Tak więc w tych warunkach fizjologicznych kilka adipocytów o pośredniej morfologii między białymi i brązowymi adipocytami pojawia się w kilku obszarach tkanki tłuszczowej. Intensywność barwienia immunologicznego jest często słabsza niż w pełni zróżnicowanych brązowych adipocytach (102). Zaproponowano zatem używanie terminu beżowy dla tych komórek (całkiem właściwe, aby wskazać etap różnicowania pośredni między bielą a brązem, a także odpowiadający

rzeczywistemu kolorowi tych komórek za pomocą powszechnych technik barwienia immunologicznego) (102). Pierwotne oznaczenie beżu zaproponowano dla wszystkich immunoreaktywnych adipocytów UCP1 pojawiających się w WAT po ekspozycji na zimno (102). Ponadto znaczenie aktywności BAT w zapobieganiu otyłości, cukrzycy typu 2 i miażdżycy tętnic zdecydowanie sugeruje, że konwersja WAT do BAT (brązowienie) może być pełnić istotną rolę w zmniejszaniu masy ciała i zmniejszaniu ryzyka rozwoju współistniejących chorób. Leczenie myszy z otyłością lekami zdolnymi do wywoływania brązowienia, eksplantami BAT i transgeniczną indukcją brązowienia okazały się mieć korzystny wpływ na myszy, a ostatnie dane sugerują pozytywne skutki narażenia na zimno również u ludzi. Ćwiczenia fizyczne i wpływ na mikrobiotę jelitową to inne strategie, które, jak wykazano, powodują brązowienie i łagodzenie otyłości. Wydaje się, że mechanizmy, przez które wysiłek fizyczny wywołuje brązowienie, obejmują produkcję miokina o właściwościach brązowienia (takich jak: iryzyna) (103).

1.5.4. Różowa tkanka tłuszczowa

Kolejnym przykładem bezpośredniej konwersji dorosłej komórki do komórki innego typu, jest cykl gruczołów sutkowych. U dziewiczych myszy anatomia gruczołów mlecznych jest bardzo prosta, ponieważ pięć symetrycznych gruczołów odpowiada dokładnie całej podskórnej tkance tłuszczowej. U samców, różnica polega na tym, że u samic SAT w całości przenika przez rozgałęzione przewody zakończone sutkami. Zatem granica opisująca każdy pojedynczy gruczoł sutkowy u myszy odpowiada obszarowi rozszerzania się przewodów rozgałęzionych kończących się w konkretnym sutku (103). W okresie laktacji adipocyty prawie całkowicie zanikają, a ponad 90% objętości piersi zajmują pęcherzyki i przewody. Pod koniec laktacji adipocyty stopniowo pojawiają się ponownie, a 10 dni po zakończeniu laktacji prawie wszystkie pęcherzyki zanikają, natomiast anatomia piersi wraca do stanu pierwotnego (104). Kilka eksperymentów, w tym dane ze śledzenia linii i eksplanty znakowanej tkanki tłuszczowej, sugerują, że w czasie ciąży pęcherzyki pochodzą z bezpośredniej konwersji adipocytów do komórek produkujących mleko (102). Podczas intensywnego etapu tworzenia pęcherzyków u myszy (17-18 dzień ciąży) morfologia pęcherzyków jest w dużej mierze osobliwa, ponieważ właśnie powstałe pęcherzyki są wyściełane komórkami nabłonka o morfologii ściśle podobnej do morfologii jednokomórkowych adipocytów. Zatem pęcherzyki te są tworzone przez komórki bogate w lipidy należące do tkanki tłuszczowej i tym samym spełniające warunek, aby nazywać się adipocytami. Ponieważ tkanka tłuszczowa u ciężarnych kobiet ma barwę różową, komórki nabłonkowe tworzące pęcherzyki mlekowe zostały nazwane różowymi adipocytami (102). Mechanizmy molekularne wspierające te zjawiska

transdyferencji nie są szczegółowo poznane, ale wydaje się, że w grę wchodzi współpraca między hormonami ciążowymi i parakrynną aktywnością komórek przewodowych. Badanie ekspresji genów między oczyszczoną wyściółką tłuszczową a prawidłowymi gruczołami w różnych trymestrach ciąży wskazało na ostepontynę jako możliwy czynnik parakrynowy odpowiedzialny za transdyferencjację tkanki tłuszczowo-nabłonkowej (102).

1.5.5. Tkanka tłuszczowa szpiku kostnego

Tkanka tłuszczowa szpiku kostnego (BMAT – *ang.* bone marrow adipose tissue) wyłania się jako odrębna tkanka. Rzeczywiście, dobrze wiadomo, że adipokiny i wolne kwasy tłuszczowe uwalniane przez adipocyty mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na komórki przebudowy kości lub hematopoezy. W stanach patologicznych, takich jak osteoporoza, każda z tkanek tłuszczowych - podskórna biała WAT, trzewna WAT, BAT i BMAT - jest inaczej związana ze zmianami gęstości mineralnej kości (105). W porównaniu z podskórną lub trzewną tkanką tłuszczową, składającą się z ~ 80% dobrze upakowanych adipocytów, adipocyty BMAT powstają luźno połączone ze sobą w komórkach krwiotwórczych. Pod tym względem taka dystrybucja adipocytów nie może być określana jako tkanka tłuszczowa (105).

1.6. Fenotypy rozmieszczenia tkanki tłuszczowej

Różnice w rozmieszczeniu tkanki tłuszczowej wpływają na fenotyp reprezentowany przez człowieka – TOFI (*ang.* thin outside fat inside; chudy na zewnątrz, otyły w środku), FOTI (*ang.* fat outside thin inside; otyły na zewnątrz, chudy w środku) oraz taki, kiedy zawartość w ustroju VAT i SAT może być podobna.

Fenotyp TOFI charakteryzuje się podwyższoną zawartością trzewnej tkanki tłuszczowej oraz zmniejszoną – podskórnej. Występowanie tego fenotypu otyłości wiąże się ze zmniejszoną wydolnością fizyczną i niższą wrażliwością na insulinę oraz zwiększoną aterogennością profilu lipidowego oraz wyższym ryzykiem wystąpienia niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby. Powyższe czynniki predysponują do rozwoju zespołu metabolicznego (ZM) oraz zespołu metabolicznej otyłości z prawidłową masą ciała (MONW – *ang.* metabolically obese, normal weight) (56, 106). Masa ciała pacjentów z zespołem MONW zawiera się w zakresie normy, ale obserwowany jest u nich zwiększony obwód talii. Jest to związane z nieprawidłowym składem ciała, którego dysproporcja polega na znacznie zwiększonej zawartości tkanki tłuszczowej trzewnej i niskiej beztłuszczowej masie ciała. Prowadzi to do rozwoju zaburzeń metabolicznych, typowych dla otyłości, takich jak: insulinooporność, wysokie stężenie triglicerydów i niskie stężenie frakcji HDL cholesterolu oraz podwyższonego poziomu biomarkerów zapalnych, a także do wystąpienia chorób, rozwijających się na podłożu tych zaburzeń (107). Jednym ze sposobów określenia fenotypu TOFI jest wyznaczenie

stosunku VAT/SAT, który dla mężczyzn wynosi powyżej 1 (56, 106), a dla kobiet powyżej 0,9 (108).

II. Cele pracy

W ostatnich latach narzędzia biologii molekularnej pomogły wyjaśnić w organizmach wiele procesów biochemicznych oraz szlaków metabolicznych, które są związane z otyłością. Szeroko pojęta proteomika, która obejmuje białka wewnątrzkomórkowe jak i te wydzielane na zewnątrz komórki, pomaga w zrozumieniu sygnalizacji hormonalnej i neuroprzekaźnikowej u osób z otyłością. Jednakże, białka są kodowane przez kwasy nukleinowe DNA, które zawierają podstawową informację genetyczną. Nowe metody takie jak sekwencjonowanie, genotypowanie pomagają znaleźć miejsca polimorficznie zmienne w genomie oraz określić ich wpływ na homeostazę energetyczną organizmu. Mimo wszystko, wciąż pozostaje niejasne, czy mechanizmy populacji takie jak dryf genetyczny i dobór faworyzujący u ludzi działają tak jak w przypadku świata zwierząt i znajdują odzwierciedlenie w różnorodności genetycznej. Są też prowadzone badania opierające się różnych populacji ludzi opierające się o filogenetykę, jak również bada się wpływ mutacji na homeostazę energetyczną oraz inny nurt badań nakierowany na różnice genotypowe. Przykładem jest genotypowanie miejsc polimorficznie zmiennych (SNP). Na przestrzeni lat wytypowano i zbadano kilkanaście SNP w celu wyjaśnienia zaburzeń metabolicznych w otyłości.

Celem pracy było:

1. Oszacowanie zmienności genu MT-ATP6 mtDNA oraz stopnia spokrewnienia u pacjentów z różnym stanem odżywienia.
2. Znalezienie zależności genetycznych w genie MT-ATP6 mtDNA a fenotypami rozmieszczenia brzusznej tkanki tłuszczowej (TOFI; FOTI).
3. Określenie występowania alleli w SNP rs7849 u osób z różnym stanem odżywienia oraz fenotypem rozmieszczenia brzusznej tkanki tłuszczowej (TOFI; FOTI).
4. Analiza wpływu obecności allelu C w SNP rs7849 na gospodarkę węglowodanową i lipidową.

III. Materiał i metody

W badaniu obserwacyjnym wzięło udział 116 osób (77 kobiet i 39 mężczyzn). Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr APK.002.407.2020.). Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną, świadomą zgodę na udział w badaniu przed jego rozpoczęciem.

Do badania zakwalifikowano kobiety i mężczyzn w wieku 20-55 lat z otyłością pierwotną i prawidłową masą ciała. Kryteriami wyłączenia były: otyłość wtórna, cukrzyca typu I i II, zaostrzenie choroby wieńcowej, zaburzenia endokrynologiczne, zaburzenia łaknienia, ciąża i laktacja, stosowanie antykoncepcji hormonalnej lub hormonalnej terapii zastępczej, steroidoterapii, terapii antyretrowirusowej, wcześniejsze chirurgiczne lub farmakologiczne leczenie otyłości oraz obecność rozrusznika serca.

3.1. Analiza parametrów antropometrycznych i składu ciała

Analizę przeprowadzono w godzinach porannych, na czczo, bez intensywnej aktywności fizycznej. Masę ciała i wzrost oceniano za pomocą wagi medycznej i stadiometru RADWAG WPT 100/200 OW (RADWAG, Polska, Radom) z dokładnością do 0,01 kg dla masy ciała i 0,5 cm dla wzrostu. Następnie na podstawie uzyskanych wyników obliczono wskaźnik masy ciała (BMI, *body mass index*; kg/m²).

Badanie składu ciała wykonano metodą bioimpedancji elektrycznej przy użyciu aparatu BioScan 920-2 (Maltron, Wielka Brytania, Essex). Analiza została przeprowadzona w pozycji leżącej z wykorzystaniem 4 elektrod, które zostały naklejone na prawej ręce (na poziomie trzeciego stawu śródrečno-paliczkowego oraz na zewnętrznej części dłoni na wysokości nadgarstka), a także na prawej nodze (na poziomie trzeciego stawu śródstopno-paliczkowego oraz na zewnętrznej części stopy na wysokości stawu skokowo-goleniowego). Badanie to umożliwiło ocenę następujących parametrów: całkowitej zawartości tkanki tłuszczowej (kg, %) oraz zawartości tkanki pozatłuszczowej (kg) (109).

Przeprowadzono ocenę pola tkanki tłuszczowej podskórnej oraz pola tkanki tłuszczowej trzewnej z wykorzystaniem aparatu BioScan 920-2. Analizy te wykonano w pozycji stojącej z użyciem 4 elektrod. W celu oceny powierzchni tkanki tłuszczowej podskórnej w przekroju poprzecznym brzucha elektrody zostały naklejone na poziomie pępka (po 2 elektrody po obu jego stronach w jednej linii). Następnie, aby ocenić powierzchnię tkanki tłuszczowej trzewnej naklejono elektrody w następujący sposób: 1 elektrodę nad pępkiem, 1 elektrodę na kręgosłupie na wysokości pępka oraz 2 elektrody po lewej stronie ciała w równych odległościach). Otrzymano informację o oporze tkankowym. Uzyskane wyniki zostały opracowane

z wykorzystaniem oprogramowania Maltron BioScan 920 v1.1. Na podstawie przeprowadzonego badania oszacowano pole tkanki tłuszczowej podskórnej (cm²) i trzewnej (cm²) na wysokości pępka oraz ustalono stosunek VAT/SAT (109).

Celem określenia fenotypu TOFI (*thin outside fat inside*; chudy na zewnątrz, otyły w środku) rozkładu tkanki tłuszczowej w jamie brzusznej wykorzystano wskaźnik VAT/SAT – powyżej 1 dla mężczyzn i powyżej 0,9 dla kobiet (56, 106). Jeśli wskaźnik był poniżej bądź równy tych wartości wskaźnika, pacjentów zaliczono do fenotypu FOTI (*fat outside thin inside*; otyły na zewnątrz chudy w środku).

Na podstawie uzyskanych wyników BMI, uczestników podzielono na grupę badaną (n=75) i kontrolną (n=41). Grupę badaną stanowiło 46 kobiet i 29 mężczyzn z otyłością pierwotną (BMI=30,0–39,9 kg/m²). Grupę kontrolną stanowiło 31 kobiet i 10 mężczyzn o prawidłowej masie ciała (BMI=18,5–24,9 kg/m²).

3.2. Badania biochemiczne krwi

Następnego dnia pacjentów skierowano do Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku celem oznaczenia stężenia wybranych parametrów biochemicznych krwi (stężenie glukozy, insuliny, cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i HDL, triglicerydów). Wszyscy pacjenci byli na czczo (co najmniej po 8 godzinnej przerwie od ostatniego posiłku). Na podstawie wyników stężenia insuliny i glukozy na czczo, obliczono wskaźnik HOMA-IR zgodnie z następującym wzorem:

$$HOMA - IR = \frac{\text{glukoza na czczo (mg/dl)} \times \text{insulina na czczo } \left(\frac{\mu\text{U}}{\text{ml}}\right)}{405}$$

Na te badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr R-I-002/647/2019 oraz APK.002.39.2021).

3.3. Izolacja DNA

W celu zbadania sekwencji genu SCD oraz MT-ATP6 pobrano wymaz z jamy ustnej (policzki i podniebienie) sterylnym zestawem wymazowym (SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Niemcy).

Do izolacji DNA z wymazów z jamy ustnej użyto odczynników z zestawu Swab DNA Isolation Kit firmy A&A Biotechnology (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Dolną część pałeczek z pobranym nabłonkiem odcinano i umieszczano w 2 ml probówce (Eppendorf, Hamburg, Niemcy). Dodano 700 µl roztworu do lizy RL i 20 µl proteiny K. Całość mieszano i inkubowano przez 24h w temperaturze 50°C. Następnie roztwór pobrano z probówek

i naniesiono na kolumny do oczyszczania DNA i wirowano przez 1 minutę przy 13 200 RPM (Revolutions Per Minute) w wirówce Eppendorf 5810R Centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Niemcy). Kolumny przeniesiono do 2 ml probówek (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) i dodano 500 µl roztworu płuczającego A1 (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Próbkę ponownie odwirowano, przeniesiono do nowych 2 ml probówek (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) i dodano roztwór płuczający. Próbkę wirowano przez 2 minuty przy 13 200 RPM. Wyszuszone minikolumny umieszczono w nowych 1,5 ml probówkach (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) i dodano 80 µl buforu do elucji ogrzanego do 75°C (10 mM TRIS-HCl, pH 8,5). Wszystkie odczynniki otrzymano w zestawie firmy A&A Biotechnology (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska).

3.4. Gen MT-ATP6 – reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

Przeprowadzono replikację fragmentu DNA zawierającego gen MT-ATP6 o długości 791 par zasad. Przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z: 1,7 µL A&A Biotechnology PCR Mix (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) (1x), 0,3 µL mieszanki starterów firmy Genomed (Genomed, Warszawa, Polska), 1 µL wody i 2 µl DNA. Do amplifikacji odcinka MT-ATP6 F 5'-**CTC ACC AAA GCC CAT AAA** -3' i R użyto następujących starterów: 5'-**AGG CGA CAG CGA TTT CTA** -3' (110). Profil reakcji łańcuchowej polimerazy składał się z następujących etapów: początkowa denaturacja w 95°C przez 10 minut, 40 cykli denaturacji w 94°C przez 45 sekund, 40 cykli elongacji w 72°C przez 45 sekund. i końcowy cykl wydłużania w 60°C przez 10 min. Do oczyszczania produktów reakcji PCR mieszaninę reakcyjną składającą się z: 0,5 µl Exo-I (20 u/µl), 1 µl FastAP (1 u/µl) i 5 µl produktu PCR. Profil oczyszczania w reakcji PCR był następujący: aktywacja enzymów w 37°C przez 15 min i inaktywacja enzymów w 85°C przez 15 min. W reakcji PCR zastosowano termocykler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Waltham, USA). Całość prac laboratoryjnych wykonywano w Zakładzie Higieny, Epidemiologii i Ergonomii. Następnie próbki wysłano do firmy MacroGen Europe w Holandii w celu sekwencjonowania metodą Sanger.

3.5. Gen SCD – reakcja łańcuchowa polimerazy PCR

Do reakcji PCR, przygotowano mieszaninę reakcyjną składającą się z: 1,7 µL A&A Biotechnology PCR Mix (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) (1x), 0,3 µL mieszanki starterów firmy Genomed (Genomed, Warszawa, Polska), 1 µL wody i 2 µl DNA. Do amplifikacji odcinka genu SCD użyto następujących starterów: F –**GCA GTG TCT CCA CCT ACA CC**-3' oraz R: 5'-**TCA GCA GGG TTT GTG GTA TC**-3'. Profil reakcji

łańcuchowej polimerazy składał się z następujących etapów: początkowa denaturacja w 95°C przez 10 minut, 40 cykli denaturacji w 94°C przez 45 sekund, 40 cykli elongacji w 72°C przez 45 sekund. i końcowy cykl wydłużania w 60°C przez 10 min. Do oczyszczania produktów reakcji PCR mieszaninę reakcyjną składającą się z: 0,5 µl Exo-I (20 u/µl), 1 µl FastAP (1 u/µl) i 5 µl produktu PCR. Profil oczyszczania w reakcji PRC był następujący: aktywacja enzymów w 37°C przez 15 min i inaktywacja enzymów w 85°C przez 15 min. W reakcji PCR zastosowano termocykler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Waltham, USA). Całość prac laboratoryjnych wykonywano w Zakładzie Higieny, Epidemiologii i Ergonomii. Następnie próbki wysłano do firmy Macrogen Europe w Niderlandach w celu sekwencjonowania metodą Sangera.

3.6. Analizy statystyczne oraz bioinformatyczne

W celu obliczenia różnic antropometrycznych z uwzględnieniem płci między grupami oraz wewnątrz grup pacjentów zastosowano nieparametryczny Test U Manna-Whitneya, który został przeprowadzony przy pomocy programu STATISTICA 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska). Przyjęto poziom istotności $p < 0,05$. Wyznaczono wartości mediany oraz dolnego i górnego kwartyła .

Celem dopasowania sekwencji i identyfikacji polimorfizmów w genach SCD i MT-ATP6 użyto programów BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (North Carolina, USA) i Chromas Lite v.2.01 (Technelysium Pty Ltd, 2005, South Brisbane, Australia).

Program DnaSP6 (Barcelona, Hiszpania) wykorzystano do określenia liczby haplotypów genu MT-ATP6 występujących wśród pacjentów. Program Arlequin 3.5 (Bern, Szwajcaria) posłużył do obliczenia podstawowych parametrów opisujących zmienność mtDNA, takich jak: liczba haplotypów (N_h), różnorodność haplotypów (h), różnorodność nukleotydów (π). Program MEGA11 (Pensylwania, USA) został wykorzystany do narysowania sieci haplotypów, a drzewo filogenetyczne skonstruowano metodą łączenia sąsiadów (NJ) w oparciu o oprogramowanie MT-ATP6 mtDNA Genepop v4.0 (Montpellier, Francja), które zostało użyte do obliczenia wartości FST między haplotypami w oparciu o zmienność mtDNA MT-ATP6.

Aby sprawdzić różnice pomiędzy pacjentami z różnymi wariantami SNP rs7849 w stężeniach na czczo: glukozy, insuliny, cholesterolu całkowitego, frakcji LDL cholesterolu, frakcji HDL cholesterolu, triglicerydów oraz we wskaźniku HOMA-IR użyto nieparametrycznego Testu U Manna-Whitneya. Celem sprawdzenia czy obecność wybranego allelu jest czynnikiem wpływającym na gospodarkę węglowodanową i lipidową, wykonano

jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. W obu przypadkach poziom istotności statystycznej przyjęto dla $p < 0,05$. Analizy statystyczne zostały wykonane przy pomocy programu STATISTICA 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska). Obliczona została również heterozygotyczność obserwowana (H_o) oraz heterozygotyczność spodziewana (H_e), a przy pomocy testu chi-kwadrat oceniono czy badani pacjenci są w równowadze Hardy'ego-Weinberg'a.

IV. Wyniki

4.1. Charakterystyka badanych grup pod względem parametrów antropometrycznych

Badaniami objęto 116 osób (77 kobiet i 39 mężczyzn). Grupę badaną stanowiło 75 osób (46 kobiet i 29 mężczyzn) z otyłością. Natomiast grupa kontrolna obejmowała 41 osób (31 kobiet i 10 mężczyzn) z prawidłową masą ciała. Charakterystykę badanych grup pod względem parametrów antropometrycznych przedstawiono w Tabeli I. (kobiety) oraz w Tabeli II. (mężczyźni).

Tabela I. Podstawowe parametry antropometryczne kobiet obu badanych grup.

Zmienna	Grupa badana			Grupa kontrolna			P
	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	
WIEK (lata)	46,50	41,00	52,00	36,00	30,00	45,00	0,000232
WZROST (cm)	164,25	159,00	169,00	163,00	160,00	170,00	0,848540
MASA CIAŁA (kg)	93,00	87,00	99,00	63,00	58,00	66,00	0,000000
OBWÓD TALII (cm)	107,00	104,00	112,00	81,00	78,00	85,00	0,000000
OBWÓD BIODER (cm)	118,50	115,00	123,00	97,00	94,00	101,00	0,000000
BMI (kg/m ²)	34,70	32,60	36,40	23,00	21,90	24,50	0,000000

p – istotność statystyczna różnicy zmiennej pomiędzy grupami.

Wśród kobiet różnice istotne statystycznie dotyczyły wieku ($p=0,000232$), masy ciała ($p=0,000000$), obwodu talii ($p=0,000000$), obwodu bioder ($p=0,000000$) oraz BMI ($p=0,000000$).

Tabela II. Podstawowe parametry antropometryczne mężczyzn obu badanych grup.

Zmienna	Grupa badana			Grupa kontrolna			P
	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	
WIEK (lata)	44,00	37,00	50,00	37,00	29,00	40,0	0,039710
WZROST (cm)	181,00	175,00	186,00	181,50	174,00	184,000	0,646094
MASA CIAŁA (kg)	110,50	101,00	118,50	80,50	76,00	83,00	0,000000
OBWÓD TALII (cm)	113,00	109,00	117,00	87,00	85,00	94,00	0,000000
OBWÓD BIODER (cm)	116,00	113,50	118,00	103,00	101,00	107,00	0,000000
BMI (kg/m ²)	33,70	31,80	35,70	24,73	24,30	24,92	0,000000

p – istotność statystyczna różnicy zmiennej pomiędzy grupami

Podobnie wśród mężczyzn różnice istotne statystycznie dotyczyły wieku ($p=0,039710$), masy ciała ($p=0,000000$), obwodu talii ($p=0,000000$), obwodu bioder ($p=0,000000$) oraz BMI ($p=0,000000$).

Charakterystykę badanych grup pod względem parametrów składu ciała przedstawiono w Tabeli III. wśród kobiet oraz w Tabeli 4. wśród mężczyzn.

Tabela III. Podstawowe parametry składu ciała wśród kobiet w obu badanych grupach.

Zmienna	Grupa badana			Grupa kontrolna			p
	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	
Tkanka tłuszczowa (kg)	42,15	36,22	45,01	16,97	13,85	20,41	0,000000
Tkanka tłuszczowa (%)	45,26	41,09	47,38	28,37	24,45	30,39	0,000000
Tkanka pozatłuszczowa [kg]	52,13	48,94	55,64	43,78	41,86	48,61	0,000000
VAT [cm ²]	257,50	173,00	350,00	93,00	65,00	124,00	0,000000
SAT [cm ²]	130,00	105,00	147,00	72,00	54,00	93,00	0,000000
VAT/SAT ratio	2,11	1,52	2,86	1,270	0,94	1,65	0,000035

VAT – trzewna tkanka tłuszczowa; SAT – podskórna tkanka tłuszczowa; p – istotność statystyczna różnicy zmiennej pomiędzy grupami; VAT/SAT ratio (stosunek VAT do SAT)

Wśród kobiet wszystkie parametry składu ciała były istotne statystycznie: zawartość tkanki tłuszczowej (kg) ($p=0,000000$); procentowa zawartość tkanki tłuszczowej ($p=0,000000$), tkanka pozatłuszczowa (kg) ($p=0,000000$), pole powierzchni VAT (cm²) ($p=0,000000$), pole powierzchni SAT (cm²) ($p=0,000000$) oraz stosunek VAT do SAT ($p=0,000035$).

Tabela IV. Podstawowe parametry składu ciała wśród mężczyzn w obu badanych grupach.

Zmienna	Grupa badana			Grupa kontrolna			P
	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	
Tkanka tłuszczowa (kg)	36,78	32,13	41,14	15,47	13,62	18,02	0,000000
Tkanka tłuszczowa (%)	33,44	30,50	36,15	19,39	16,91	21,24	0,000000
Tkanka pozatłuszczowa [kg]	70,65	67,71	78,08	43,78	41,86	48,61	0,023491
VAT [cm ²]	296,00	238,50	350,00	120,00	83,00	214,00	0,003391
SAT [cm ⁻²]	128,50	109,50	149,00	69,50	63,00	74,00	0,000000
VAT/SAT ratio	2,27	2,08	2,98	1,545	1,39	3,31	0,151480

VAT – trzewna tkanka tłuszczowa; SAT – podskórna tkanka tłuszczowa P – istotność statystyczna różnicy zmiennej pomiędzy grupami; VAT/SAT ratio – stosunek VAT do SAT

Również wśród mężczyzn parametry składu ciała były istotne statystycznie: zawartość tkanki tłuszczowej (kg) ($p=0,000000$); procentowa zawartość tkanki tłuszczowej ($p=0,000000$), tkanka pozatłuszczowa (kg) ($p=0,000000$), pole powierzchni VAT (cm²) ($p=0,000000$), pole powierzchni SAT (cm²) ($p=0,000000$). Nie stwierdzono występowania istotności statystycznej w stosunku VAT do SAT ($p=0,151480$).

4.2. Ocena zróżnicowania genetycznego w genie MT-ATP6 u osób z różnym stopniem odżywienia.

Po odczytaniu sekwencji genu mtDNA MT-ATP6 ze wszystkich próbek wyróżniono 52 haplotypy. Najczęstszym był haplotyp H1, który był reprezentowany u 36,2% uczestników ($n=42$; 29 osób z otyłością i 13 z prawidłową masą ciała). Drugim najczęstszym haplotypem był H6, reprezentowany u 11,2% uczestników ($n=13$; 8 z otyłością i 5 z prawidłową masą ciała). Liczba haplotypów mtDNA MT-ATP6 w badanych grupach była zróżnicowana, a każda grupa posiadała haplotypy charakterystyczne tylko dla niej. W grupie badanej (z otyłością) były to haplotypy H3-H5, H7-H13 i H15-H31, a w grupie kontrolnej były to haplotypy H33-H52. Wartości wariancji genetycznej F_{st} obliczone z obserwowanej zmienności MT-ATP6 nie były wysokie (0,0046), co w skali Wrighta wskazuje na bardzo niską zmienność genetyczną między grupami. Wyniki przedstawiono w tabeli V.

Tabela V. Liczba haplotypów wyodrębnionych w badanych grupach.

Haplotyp	Liczebność w grupie badanej	Liczebność w grupie kontrolnej	Liczebność całkowita
H1	29	13	42
H2	7	1	8
H3	1	0	1
H4	3	0	3
H5	1	0	1
H6	8	5	13
H7	1	0	1
H8	1	0	1
H9	1	0	1
H10	1	0	1
H11	1	0	1
H12	1	0	1
H13	1	0	1
H14	1	1	2
H15	1	0	1
H16	1	0	1
H17	1	0	1
H18	1	0	1
H19	1	0	1
H20	1	0	1
H21	1	0	1
H22	1	0	1
H23	1	0	1
H24	1	0	1
H25	1	0	1
H26	1	0	1
H27	1	0	1
H28	1	0	1
H29	1	0	1
H30	1	0	1
H31	1	0	1
H32	1	1	2
H33	0	1	1
H34	0	1	1
H35	0	1	1
H36	0	1	1
H37	0	1	1
H38	0	1	1
H39	0	1	1
H40	0	1	1
H41	0	1	1
H42	0	1	1
H43	0	1	1
H44	0	1	1
H45	0	1	1
H46	0	1	1
H47	0	1	1
H48	0	1	1
H49	0	1	1
H50	0	1	1
H51	0	1	1
H52	0	1	1

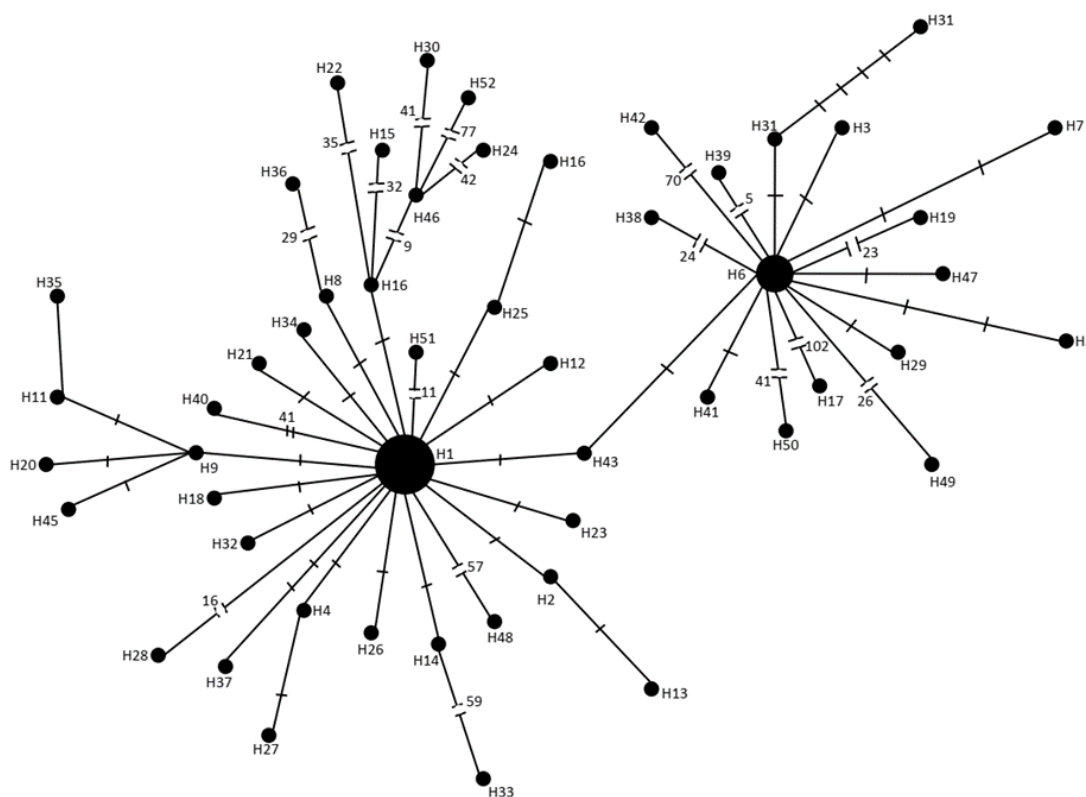
Oceniono również podstawowe parametry opisujące zmienność, takie jak różnorodność haplotypowa i różnorodność nukleotydowa. Pod względem liczby haplotypów grupa badana była bardziej zróżnicowana i liczyła 32 haplotypy ($N_h = 32$). U pacjentów z grupy kontrolnej liczba haplotypów wynosiła 25 ($N_h = 25$). Zróżnicowanie haplotypów (h) było wyższe u osób z otyłością ($h=0,86189$) niż u osób z prawidłową masą ciała ($h=0,83846$). Jednak różnorodność nukleotydowa (π) była bardziej zróżnicowana u uczestników z grupy kontrolnej ($\pi=0,0519$) w porównaniu z grupą badaną ($\pi=0,0242$). Wyniki przedstawiono w Tabeli VI.

Tabela VI. Podstawowe parametry opisujące zmienność w MT-ATP6.

Grupa	N	N_h	h	π
Grupa badana	75	32	0.86189	0.0242
Grupa kontrolna	41	25	0.83846	0.0519

N – wielkość próby; N_h – liczba haplotypów; h – zmienność haplotypowa; π – zmienność nukleotydowa

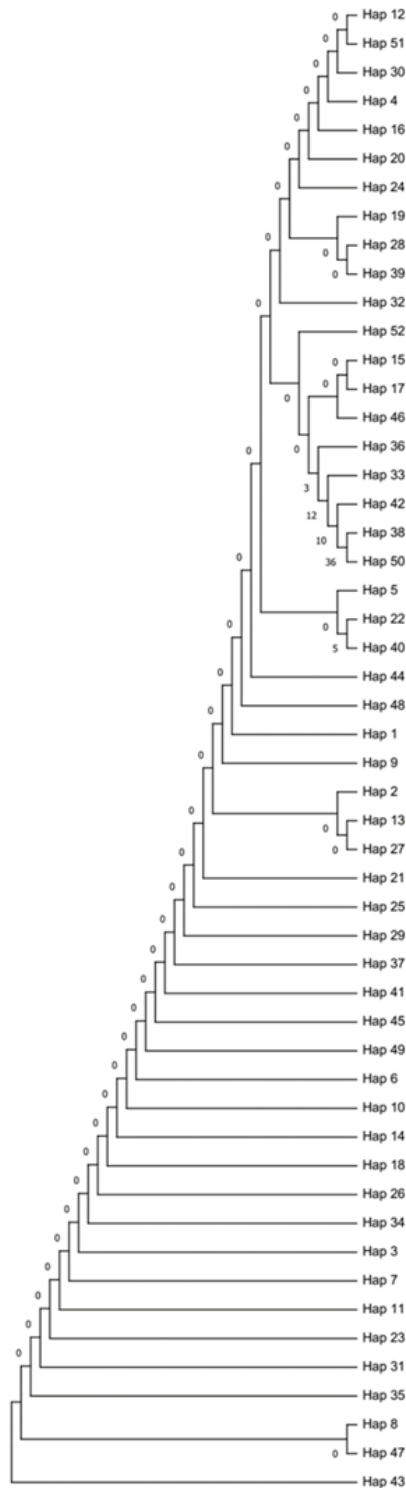
Następnie narysowano sieć haplotypów genu mtDNA MT-ATP6, która została przedstawiona na Rycinie 1.



Rycina 1. Sieć haplotypów genu MT-ATP6.

Wykazano, że głównymi haplotypami były H1 i H6, natomiast od nich odchodzą kolejne haplotypy różniące się od 1 do 102 mutacji.

Celem potwierdzenia różnic genetycznych wyrysowano drzewo filogenetyczny typu N-J genu MT-ATP6, co zilustrowano na Rycinie 2.

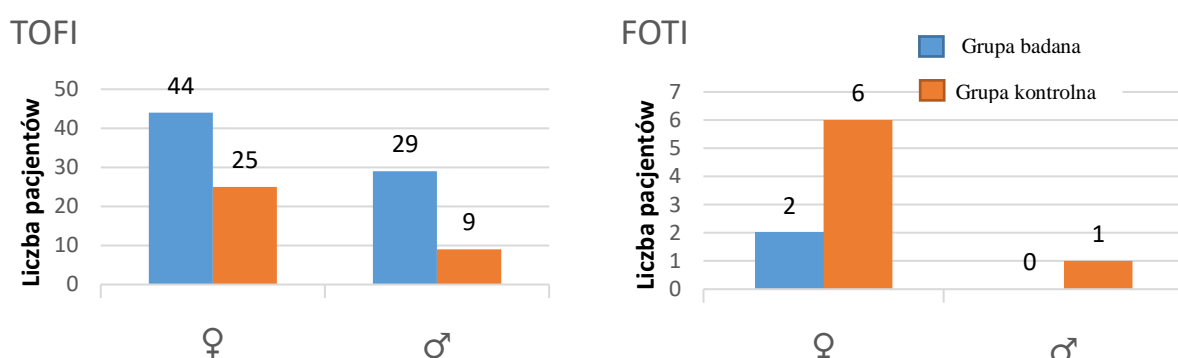


Rycina 2. Drzewo filogenetyczne maksymalnej parsymonii dla haplotypów MT-ATP6 mtDNA.

Drzewo filogenetyczne maksymalnej parsymonii dla haplotypów nie wykazało znaczących różnic genetycznych. Zakres rozwidleń gałęzi wynosił od 0 do 5. Drzewo filogenetyczne przedstawiające zależności między haplotypami mtDNA wykazało, że większość haplotypów skupia się razem. Przy tworzeniu drzewa filogenetycznego stosuje się tzw. „outgroup’ę”. Jednakże ze względu na fakt, że mtDNA naczelnych jest zbyt blisko spokrewnione z ludzkim, nie zastosowano w tej analizie „outgrup’y”.

4.3. Ocena fenotypów rozmieszczenia tkanki tłuszczowej brzusznej (TOFI i FOTI)

Na podstawie oceny składu ciała i rozmieszczenia tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej, oceniono występowanie dwóch fenotypów TOFI (*thin outside fat inside*) oraz FOTI (*fat outside thin inside*) co przedstawiono na Rycinie 3.



Rycina 3. Liczba fenotypów TOFI i FOTI w zależności od płci i stanu odżywienia.

Stwierdzono, że fenotyp tkanki tłuszczowej brzusznej TOFI występował u 96% (n=44) kobiet z otyłością i u 81% (n=25) kobiet z prawidłową masą ciała. Fenotyp FOTI stwierdzono u 4% (n=2) kobiet z otyłością i u 19% (n=6) kobiet z prawidłową masą ciała. Wśród mężczyzn 100% (n=29) uczestników z grupy badanej i 90% (n=9) pacjentów z grupy kontrolnej reprezentowało fenotyp TOFI, podczas gdy tylko jeden mężczyzna (10% grupy z prawidłową masą ciała) reprezentował fenotyp FOTI.

4.4. Analiza przynależności fenotypów FOTI i TOFI do haplotypów genu MT-ATP6

Oceniono również przynależność pacjentów reprezentujących fenotypy TOFI i FOTI do poszczególnych haplotypów, co zostało przedstawione w Tabeli VII.

Tabela VII. Liczba haplotypów genu MT-ATP6 wśród fenotypów TOFI i FOTI.

Haplotypy	TOFI	FOTI	Całkowita liczba
H1	41	1	42
H2	7	1	8
H3	1	0	1
H4	3	0	3
H5	1	0	1
H6	13	0	13
H7	1	0	1
H8	2	0	2
H9	1	0	1
H10	1	0	1
H11	1	0	1
H12	1	0	1
H13	1	0	1
H14	2	0	2
H15	1	0	1
H16	1	0	1
H17	1	0	1
H18	1	0	1
H19	1	0	1
H20	1	0	1
H21	1	0	1
H22	1	0	1
H23	1	0	1
H24	0	1	1
H25	1	0	1
H26	1	0	1
H27	1	0	1
H28	1	0	1
H29	1	0	1
H30	1	0	1
H31	1	0	1
H32	1	0	1
H33	0	1	1
H34	1	0	1
H35	0	1	1
H36	1	0	1
H37	1	0	1
H38	1	0	1
H39	1	0	1
H40	0	1	1
H41	1	0	1
H42	0	1	1
H43	1	0	1
H44	1	0	1
H45	1	0	1
H46	1	0	1
H47	1	0	1
H48	1	0	1
H49	0	1	1
H50	0	1	1
H51	1	0	1
H52	1	0	1

Wśród fenotypów TOFI najliczniejszymi haplotypami były: H1, który stanowił 36,2% badanych osób (n=42) i H6, stanowiący 11,2% badanych osób (n=13). Wykazano, że haplotyp H6 był reprezentowany tylko przez fenotyp TOFI. Wśród fenotypów FOTI charakterystycznymi haplotypami były H24, H33, H35, H40, H42, H49 i H50.

4.5. Ocena wybranych parametrów biochemicznych w surowicy (na czczo) wśród osób obu badanych grup

Na podstawie uzyskanych wyników biochemicznych (na czczo) w surowicy obu badanych grup (Tabela VIII. – kobiety; Tabela IX. – mężczyźni) stwierdzono, że osoby z otyłością różniły się istotnie statystycznie względem osób z prawidłową masą ciała pod względem parametrów gospodarki węglowodanowej i lipidowej.

Tabela VIII. Wybrane parametry biochemiczne krwi na czczo wśród kobiet obu badanych grup.

Zmienna	Grupa badana			Grupa kontrolna			P
	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	194,00	180,00	224,00	196,00	179,00	217,00	0,752836
HDL (mg/dl)	55,00	48,00	61,00	63,00	59,00	83,00	0,000084
LDL (mg/dl)	117,00	99,00	141,00	94,00	71,00	112,00	0,000344
TG (mg/dl)	101,50	74,00	134,00	61,00	49,00	83,00	0,000001
Glukoza (mg/dl)	95,00	89,00	104,00	90,00	85,00	94,00	0,012628
Insulina (μ U/ml)	9,70	7,80	13,70	5,80	4,50	7,90	0,000000
Wskaźnik HOMA-IR	2,25	1,85	3,380	1,25	1,01	1,78	0,000001

p – istotność statystyczna różnicy zmiennej

Wśród kobiet obu grup, z parametrów biochemicznych krwi, jedynie stężenie cholesterolu całkowitego okazało się nieistotnie statystycznie ($p=0,752836$). Różnice pozostałych zmiennych były istotne statystycznie dla stężenia glukozy ($p=0,012628$) oraz wysoko istotne statystycznie dla pozostałych badanych parametrów.

Tabela IX. Wybrane parametry biochemiczne krwi na czczo wśród mężczyzn obu badanych grup.

Zmienna	Grupa badana			Grupa kontrolna			P
	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	Mediana	Dolny Kwartyl.	Górny Kwartyl.	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	216,00	189,00	236,00	187,00	170,00	214,00	0,085374
HDL (mg/dl)	43,00	38,00	47,00	46,50	42,00	51,00	0,145341
LDL (mg/dl)	142,00	119,00	156,00	104,50	98,00	124,00	0,014799
TG (mg/dl)	153,00	109,00	216,00	98,50	78,00	108,00	0,012145
Glukoza (mg/dl)	102,00	90,00	110,00	94,00	90,00	97,00	0,164307
Insulina (μ U/ml)	14,40	9,30	16,90	7,50	6,30	8,50	0,000571
Wskaźnik HOMA-IR	3,65	2,22	4,55	1,75	1,42	1,90	0,000571

p – istotność statystyczna różnicy zmiennej

U mężczyzn istotne różnice w parametrach biochemicznych krwi wykazano w stężeniach na czczo: cholesterolu frakcji LDL ($p=0,014799$), triglicerydów ($p=0,012145$), insuliny ($p=0,000571$) oraz wskaźnika HOMA-IR ($p=0,000571$). Nieistotnie statystycznie okazało się stężenie na czczo cholesterolu całkowitego ($p=0,085374$), cholesterolu HDL ($p=0,145341$) oraz glukozy ($p=0,164307$).

4.6. Analiza obecności alleli SNP rs7849

Podczas sekwencjonowania fragmentu genu SCD zawierającego SNP rs7849 stwierdzono wśród pacjentów obecność homozygot TT, których w grupie badanej było 81,3% ($n=61$), a w grupie kontrolnej – 44% ($n=18$). Natomiast heterozygoty w grupie badanej stanowiły 18,7% ($n=14$), a w grupie kontrolnej 49% ($n=20$). Nie zaobserwowano homozygot CC w grupie badanej, a w grupie kontrolnej stanowiły one 7% obserwacji ($n=3$). Wyniki przedstawiono w Tabeli X.

Tabela X. Liczebność wariantów alleli wśród pacjentów obu badanych grup (kobiet i mężczyzn).

Allel	Grupa badana	Grupa kontrolna
TT	81,3% ($n=61$)	44% ($n=18$)
TC	18,7% ($n=14$)	49% ($n=20$)
CC	-	7% ($n=3$)

Została sprawdzona liczebność wariantów alleli wśród fenotypów TOFI oraz FOTI z podziałem na pacjentów z otyłością oraz z prawidłową masą ciała. Wyniki przedstawiono w Tabeli XI.

Tabela XI. Liczebność wariantów alleli wśród fenotypów TOFI i FOTI z podziałem na grupę badaną i kontrolną (kobiet i mężczyzn).

Allel	TOFI		FOTI	
	Grupa badana	Grupa kontrolna	Grupa badana	Grupa kontrolna
TT	80% (n=60)	40% (n=16)	1,3% (n=1)	4,9% (n=2)
TC	17,4% (n=13)	35,6% (n=15)	1,3% (n=1)	12,2% (n=5)
CC	-	7,3% (n=3)	-	-

Homozygoty TT reprezentujące fenotyp TOFI stanowiły 80% (n=60) grupy badanej, a homozygoty TT reprezentujące fenotyp FOTI stanowiły 1,3% (n=1) grupy badanej. Odsetek heterozygot TC z fenotypem TOFI w grupie badanej wynosił 17,4% (n=13), a FOTI 1,3% (n=1). W grupie kontrolnej odsetek osób homozygotycznych TT z fenotypem TOFI stanowiło 40% (n=16) grupy, a reprezentujące fenotyp FOTI 4,9% (n=2). Heterozygoty TC z fenotypem TOFI stanowiły 35,6% (n=15), a z fenotypem FOTI 12,2% (n=5). Homozygoty CC zaobserwowano tylko w grupie kontrolnej i tylko wśród osób z fenotypem TOFI – 7,3% (n=3).

Na podstawie liczebności genotypów, obliczona została wartość heterozygotyczności obserwowanej (H_o) oraz heterozygotyczności spodziewanej (H_e). W Tabeli XII. zostały przedstawione wyniki powyższych analiz.

Tabela XII. Heterozygotyczność obserwowana (H_o) oraz heterozygotyczność spodziewana (H_e) wśród badanych pacjentów z podziałem na wariant allelu.

Allel	H_o	H_e	Liczba stopni swobody	P
TT	0,681034483	0,68489893	2	1,000000
TC	0,293103448	0,299643282	2	1,000000
CC	0,034482759	0,032773484	2	1,000000

p – istotność statystyczna

Stwierdzono, że heterozygotyczność obserwowana dla homozygot TT wyniosła 0,681034483, a spodziewana 0,68489893, dla heterozygot TC heterozygotyczność obserwowana wyniosła 0,293103448, a spodziewana 0,299643282, natomiast dla homozygot CC heterozygotyczność obserwowana wyniosła 0,034482759 a spodziewana 0,032773484. Liczba stopni swobody wyniosła 2. We wszystkich przypadkach różnice nie były istotne statystycznie, zatem cała badana grupa pacjentów (z otyłością oraz prawidłową masą ciała) była w równowadze Hardy’ego-Winberg’a.

4.7. Analiza wpływu alleli SNP rs7849 na parametry biochemiczne krwi.

Sprawdzono czy wariant allelu może mieć wpływ na parametry biochemiczne krwi. W tym celu oceniono czy stężenia badanych parametrów w surowicy krwi na czczo różnią się istotnie statystycznie w grupie pacjentów, u których nie obserwowano allelu C względem pacjentów, u których ten allel obserwowano. Wyniki przedstawiono w Tabeli XIII.

Tabela XIII. Różnice statystyczne pomiędzy allelami T i C a parametrami biochemicznymi w krwi w całej grupie (osób obu płci z otyłością i prawidłową masą ciała).

Zmienna	Pacjenci bez allelu C (TT; n=79)		Pacjenci z allelem C (TC, CC; n=37)		p
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	197,00	179,00 - 232,00	199,0000	181,00 - 219,00	0,822711
HDL (mg/dl)	48,00	43,00 - 60,00	60,0000	53,00 - 71,00	0,000210
LDL (mg/dl)	119,00	97,00 - 149,00	104,0000	82,00 - 130,00	0,048229
TG (mg/dl)	108,00	74,00 - 153,00	78,0000	57,00 - 101,00	0,001013
Glukoza (mg/dl)	97,00	90,00 - 106,00	90,0000	83,00 - 94,00	0,000016
Insulina (μ U/ml)	11,10	8,60 - 15,10	5,8000	4,80 - 6,30	0,000000
Wskaźnik HOMA-IR	2,59	2,01 - 3,89	1,2200	1,04 - 1,45	0,000000

p – istotność statystyczna

Zaobserwowano, że pacjenci, którzy posiadają allel C różnią się istotnie od pacjentów, którzy tego allelu nie posiadają pod względem stężenia w surowicy krwi na czczo: cholesterolu HDL ($p=0,000210$), cholesterolu LDL ($p=0,048229$), triglicerydów ($p=0,001013$), glukozy ($0,000016$), zawartości insuliny ($p=0,000000$) oraz wskaźnika HOMA-IR ($p=0,000000$). Pacjenci posiadający allel C charakteryzowali się niższymi stężeniami: cholesterolu LDL, triglicerydów, glukozy, insuliny oraz niższym wskaźnikiem HOMA-IR. Mieli oni natomiast, wyższe stężenie frakcji HDL cholesterolu w porównaniu do pacjentów bez allelu C (TT). Następnie sprawdzono, czy posiadanie wariantu allelu C w SNP rs7849 jest istotnym statystycznie czynnikiem różnicującym stężenia wybranych parametrów biochemicznych w surowicy krwi. Wyniki przedstawiono w Tabeli XIV.

Tabela XIV. Analiza posiadania allelu C jako czynnika wpływającego na stężenia wybranych parametrów biochemiczny krwi w całej grupie (osób z otyłością i prawidłową masą ciała, kobiet i mężczyzn).

Zmienna	Stopnie swobody	F	p
Cholesterol całkowity (mg/dl)	1	0,038	0,846200
HDL (mg/dl)	1	10,600	0,001490
LDL (mg/dl)	1	4,273	0,040992
TG (mg/dl)	1	6,2259	0,014022
Glukoza (mg/dl)	1	11,666	0,000883
Insulina (μ U/ml)	1	33,9754	0,000000
Wskaźnik HOMA-IR	1	27,4984	0,000001

p – istotność statystyczna

Jednoczynnikowa analiza wariancji potwierdziła istotność statystyczną posiadania allelu C jako czynnika wpływającego na stężenia: cholesterolu HDL ($p=0,001490$), cholesterolu LDL ($p=0,040992$), triglicerydów ($p=0,014022$), glukozy ($p=0,000883$), insuliny ($p=0,000000$) oraz wskaźnika HOMA-IR ($p=0,000001$). Nieistotny statystycznie okazał się jedynie wpływ na stężenie cholesterolu całkowitego ($p=0,846200$). Potwierdzono tym samym, że osoby posiadające allel C (CT oraz CC), charakteryzowały się niższymi stężeniami badanych parametrów w surowicy krwi.

Aby sprawdzić, czy tylko wariant allelu C (TC, CC) wpływa na gospodarkę lipidową i węglowodanową, sprawdzono czy stężenie badanych parametrów w surowicy na czczo różnią się istotnie wewnątrz grupy pacjentów z otyłością (Tabela XV) oraz wśród pacjentów z prawidłową masą ciała (Tabela XVI) z podziałem na obecność allelu C.

Tabela XV. Różnice statystyczne pomiędzy allelami T i C a parametrami biochemicznymi w krwi wewnątrz grupy pacjentów z otyłością (osób obu płci).

Zmienna	Pacjenci bez allelu C (TT; n=61)		Pacjenci z allelem C (TC, CC; n=14)		p
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	203,00	181,00 - 232,00	216,00	186,00 - 231,00	0,4285
HDL (mg/dl)	47,00	42,00 - 56,00	54,00	50,00 - 60,00	0,0421
LDL (mg/dl)	123,00	104,00 - 154,00	130,50	104,00 - 161,00	0,6939
TG (mg/dl)	118,00	83,00 - 158,00	101,00	78,00 - 151,00	0,2876
Glukoza (mg/dl)	99,00	90,00 - 106,00	90,50	82,00 - 94,00	0,0128
Insulina (μ U/ml)	13,10	9,40 - 16,70	6,10	5,00 - 6,30	0,000000
Wskaźnik HOMA-IR	3,09	2,23 - 4,32	1,30	1,09 - 1,48	0,000000

p – istotność statystyczna

Tabela XVI. Różnice statystyczne pomiędzy allelami T i C a parametrami biochemicznymi w krwi wewnątrz grupy pacjentów z prawidłową masą ciała (osób obu płci).

Zmienna	Pacjenci bez allelu C (TT; n=18)		Pacjenci z allelem C (TC, CC; n=23)		p
	Mediana	Q1-Q3	Mediana	Q1-Q3	
Cholesterol całkowity (mg/dl)	186,50	180,00 - 209,00	196,00	172,00 - 232,00	0,8201
HDL (mg/dl)	55,00	55,00 - 74,00	62,00	47,00 - 82,00	0,2642
LDL (mg/dl)	103,00	71,00 - 115,00	97,00	86,00 - 116,00	0,4231
TG (mg/dl)	71,500	52,00 - 84,00	65,00	54,00 - 99,00	0,5027
Głukoza (mg/dl)	92,50	83,00 - 94,00	88,50	90,00 - 98,00	0,0197
Insulina (μ U/ml)	8,20	4,30 - 6,20	5,600	7,30 - 9,00	0,000000
Wskaźnik HOMA-IR	1,96	1,01 - 1,39	1,130	1,50 - 2,22	0,000000

p – istotność statystyczna

W grupie pacjentów z otyłością (pomiędzy pacjentami z obserwowanym allelem C i bez obserwacji allelu C) odnotowano istotne statystycznie różnice w stężeniach cholesterolu HDL ($p=0,0421$), glukozy ($p=0,0128$), insuliny ($p=0,00000$) oraz wskaźnika HOMA-IR ($p=0,00000$). Natomiast nieistotne okazały się stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL oraz triglicerydów. Wśród pacjentów z prawidłową masą ciała (pomiędzy pacjentami z obserwowanym allelem C i bez obserwacji allelu C) istotnie różniły się stężenia glukozy ($p=0,0197$), insuliny ($p=0,00000$) oraz wskaźnik HOMA-IR ($p=0,00000$). W tej grupie, stwierdzono brak istotności statystycznej w stężeniach cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL oraz triglicerydów.

V. Dyskusja

Do pierwszych dziesięcioleci ubiegłego stulecia otyłość była uważana za symbol piękna, zdrowia i bogactwa. W okresach głodu, kiedy wielu ludzi umierało z tego powodu, nadwaga była wręcz czynnikiem ochronnym. W niektórych kulturach zwiększanie masy ciała było i nadal jest celowo wykorzystywane w celu uczynienia człowieka atrakcyjnym do małżeństwa (111). Dla każdego człowieka, tzw. „normy” ciała lub preferencje dotyczące rozmiaru ciała mogą kształtować indywidualne wybory. W społeczeństwach, w których duży rozmiar ciała jest uważany za piękny (jak np. na niektórych wyspach Pacyfiku)(112), otyłość może rozwijać się szybciej niż w krajach takich jak Japonia, gdzie norma społeczna faworyzuje „małe ciało” (113). Z drugiej strony etnograficzne badania terenowe w dwóch krajach o wysokim rozpowszechnieniu otyłości, Nauru i Samoa, sugerują, że interwencje dotyczące otyłości niekoniecznie były nieskuteczne, ale kolidowały z lokalnymi normami ciała — wręcz przeciwnie, wydawały się zawodzić, ponieważ na nowo definiowały normy ciała w sposób, który przeciwdziałał zamierzonemu celowi (114).

Pandemia otyłości rozpoczęła się w krajach o wysokich dochodach w latach 70. XX wieku, a następnie w większości krajów o średnich dochodach, a ostatnio w niektórych krajach o niskich dochodach (4). Ten wzorzec sugeruje, że rosnący poziom otyłości zbiega się z poprawą gospodarki i bogactwa. Jak pokazują przykłady z Brazylii i innych krajów rozwijających się, rozpowszechnienie otyłości zwykle wzrasta najpierw u osób o wyższym statusie społeczno-ekonomicznym na obszarach miejskich, a następnie przesuwa się w kierunku grup o niższym statusie społeczno-ekonomicznym, głównie na obszarach wiejskich, równoległe z poprawiającą się gospodarką danego kraju (115, 116).

Jak już zostało wspomniane, otyłość jest wynikiem wzajemnego oddziaływania czynników heterogenicznych, wynikających ze sposobu odżywiania się danej osoby, aktywności fizycznej oraz indywidualnych uwarunkowań wydatku energetycznego. Biorąc pod uwagę rozpowszechnienie na całym świecie diety zawierającej wysoki poziom węglowodanów i tłuszczu, o dużej gęstości energetycznej i niskiej zawartości błonnika, można by oczekiwać, że u każdego rozwinie się otyłość w tych warunkach. Te zmiany w systemie żywnościowym są niewątpliwie ważnym motorem pandemii otyłości. Jednak w danym środowisku — od kraju do miasta, dzielnicy, a nawet rodziny — masa ciała znacznie się różni (4). Podejrzewa się, że efekty genetyczne i/lub epigenetyczne, a także czynniki behawioralne są ważnymi modyfikatorami lub moderatorami równowagi energetycznej. Niektóre cechy leżące u podstaw heterogenicznej odpowiedzi biologicznej na wspólne środowiska nie występują tylko u ludzi.

Na przykład szczep myszy C57BL/6 (który jest często używany jako mysz kontrolna) jest odporny na otyłość wywołaną dietą wysokotłuszczową (117). Zmienność genetyczna tylko w kilku loci genetycznych może wyjaśniać tę inną odpowiedź na „wyzwalacze pokarmowe” wywołujące otyłość w tym modelu mysim (117). Oczywiście u ludzi ich nawyki żywieniowe mogą również obejmować wyuczone lub nabyte zachowania, w tym rytmy posiłków, podjadanie, wzorce żywieniowe (takie jak nagradzanie się słodyczami), jak również preferowanie określonych ćwiczeń fizycznych lub odpoczynku biernego. Oprócz takich różnic behawioralnych, czynniki biologiczne (w tym brak lub niska jakość snu, czynniki psychologiczne, stygmatyzacja masy ciała i dyskryminacja) mogą mieć istotny wpływ na przyrost masy ciała (118, 119). Czynniki społeczno-kulturowe mogą również prowadzić do modyfikacji epigenetycznych w patogenezie otyłości, w tym starszy wiek kobiet w momencie pierwszego porodu, dłuższe narażenie kobiet w wieku rozrodczym na środowisko powodujące otyłość i stresory społeczne, które mogą prowadzić do znacznych zmian epigenetycznych w podatności na otyłość oraz mogą mieć wpływ na potomstwo (efekt matczyny).

5.1. Zmienność genu MT-ATP6

Współczesne badania podkreślają znaczenie masy mitochondrialnej w białej tkance tłuszczowej (WAT)(120). Komórki tłuszczowe myszy ob/ob wykazują zmniejszoną masę mitochondrialną i zmienioną strukturę mitochondrialną. Zmniejszoną masę mitochondrialną normalizuje się (czyli się zwiększa) przy leczeniu rozyglitazonem lub tiazolidynodionem. Tiazolidynodiony promują różnicowanie komórek tłuszczowych poprzez aktywację PPAR- γ . Zmniejszają ekspresję leptyny i czynnika martwicy nowotworów α (TNF α), jednocześnie zwiększając ekspresję lipazy lipoproteinowej, białka wiążącego lipidy adipocytów (aP2) i receptora GLUT- 4 (który odgrywa kluczową rolę w ułatwianiu transportu glukozy do adipocytów i mięśni szkieletowych) (121). Leczenie zwiększa wrażliwość na insulinę (122), czemu towarzyszy zwiększone utlenianie kwasów tłuszczowych w adipocytach. Mitochondria, ze względu na swoją rolę w produkcji energii, w ludzkich białych komórkach tłuszczowych mają również znaczenie dla wydatkowania energii całego organizmu. Produkcja ciepła w adipocytach osób z otyłością wzrasta po redukcji masy ciała, co wskazuje na rolę mitochondriów w ludzkich białych komórkach tłuszczowych w wymianie energii i oksydacji kwasów tłuszczowych (123). Traktowanie ludzkich komórek tłuszczowych forskoliną (czynnikiem indukującym cAMP) zwiększa liczbę kopii mtDNA i utlenianie kwasów tłuszczowych w komórkach (124). Stwierdzono, że ekspresja genów kontrolujących fosforylację oksydacyjną w mitochondriach jest obniżona w trzewnej tkance tłuszczowej

pacjentów z cukrzycą typu 2 (125). Natomiast w innych badaniach wykazano, że glitazony indukują biogenezę mitochondrialną w ludzkim WAT *in vivo* u pacjentów z cukrzycą typu 2 (124, 126). Ponadto wielonienasycone kwasy tłuszczowe n-3, o których wiadomo, że zapobiegają otyłości i insulinooporności, zwiększają biogenezę mitochondriów w białej tkance tłuszczowej poprzez biogenezę mitochondrialną, wzrost ekspresji genów tkanki tłuszczowej (w tym kilku genów zaangażowanych w utlenianie kwasów tłuszczowych) oraz również wpływa na poprawę ogólnego wychwyty glukozy stymulowanej insuliną (124, 126, 127).

W niniejszej pracy analizowano gen MT-ATP6 mtDNA, w celu oszacowania jego zmienności oraz stopnia spokrewnienia u pacjentów z różnym stanem odżywienia (otyłość vs. prawidłowa masa ciała). Wiadomym jest, że haplotypy odnoszą się do kombinacji alleli markerowych, które są zlokalizowane blisko siebie lub na tym samym chromosomie i które mają tendencję do wspólnego dziedziczenia. Dzięki dostępności markerów polimorfizmu pojedynczego nukleotydu o wysokiej gęstości, haplotypy odgrywają ważną rolę w badaniach asocjacyjnych (128). Haplotypy mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia wzorca disekwilibrum łączności (LD – *ang.* linkage disequilibrium) w ludzkim genomie, co jest niezbędne do badań asocjacyjnych (129, 130). LD odnosi się do nielosowych asocjacji alleli w haplotypach (131). Haplotypy mówią nam bezpośrednio, w jaki sposób allele są zorganizowane wzdłuż nici DNA i odzwierciedlają wzór dziedziczenia w trakcie ewolucji. Metody oparte na haplotypach mogą być silniejsze niż te oparte na pojedynczych markerach w badaniach asocjacyjnych mapowania złożonych genów chorobowych (128).

Taką zależność mamy widoczną w niniejszych badaniach, gdzie współczynnik odległości genetycznej F_{st} wyniósł 0,0046, co w skali Wrighta oznacza, że brak jest różnic genetycznych. Dodatkowo nie wykazano żadnych różnic przy tworzeniu drzewa filogenetycznego pomiędzy wyodrębnionymi haplotypami w badanych grupach, jak również nie było indywidualnych różnic genetycznych u badanych osób. Natomiast, sieć haplotypowa ukazuje duże zróżnicowanie między kilkoma haplotypami gdzie liczba mutacji od głównych haplotypów wynosi kilkadziesiąt. Dwa główne węzły haplotypowe – H1 i H6 – są charakterystyczne zarówno dla pacjentów z prawidłową masą ciała jak i z otyłością. Jednak, w obu grupach widoczne są haplotypy charakterystyczne, które nie grupują się w dwa różne węzły. Haplotypy charakterystyczne odchodzą od głównego węzła H1 oraz H6. Haplotypami charakterystycznymi dla osób z prawidłową masą ciała są: H33, H38, H42, H49, H50 i H52 i posiadają one co najmniej 40 mutacji, co sugerowałoby dużą odległość genetyczną. Lecz tak jak wcześniej wspomniano, drzewo filogenetyczne tego nie potwierdza. Tak duże odległości genetyczne w sieci haplotypowej wskazują, że na przestrzeni lat mogło dochodzić do

rozdzielenia się linii mitochondrialnych w populacji ludzkiej. Faworyzowanie konkretnych cech, w tym przypadku zmniejszone wydatkowanie energetyczne, doprowadziło do utworzenia nowej linii, w której dobór faworyzujący mógł tą cechą uwydatnić. Pomimo działania doboru faworyzującego, silny charakter konserwatywny mtDNA doprowadził do pozostania innych historycznych linii, które są widoczne w sieci. Niestety, ze względu na zbyt duży stopień spokrewnienia ludzi, w drzewach filogenetycznych, tak jak we wskaźniku F_{st} , nie ma żadnego istotnego zróżnicowania genetycznego. Również próby stworzenia outgrup'y wykazały, że pomimo dwóch odrębnych gatunków – naczelnie grupują się w mtDNA razem z człowiekiem. W niniejszym badaniu nad genem MT-ATP6, w grupie pacjentów z otyłością stwierdzono wyższą ilość haplotypów (większe zróżnicowanie haplotypowe), co sugeruje, że populacja ludzka jest bardziej podatna na otyłość. Jednocześnie, mniejsza ilość haplotypów w grupie kontrolnej potwierdza, że osoby z prawidłową masą ciała, genetycznie stanowią mniej zróżnicowaną grupę. Jednakże trzeba pamiętać, że mtDNA jest dziedziczone w linii matczynej, a na ilość tkanki tłuszczowej wpływają geny jądrowe (które są dziedziczone po obu rodzicach) oraz czynniki epigenetyczne. Populacja ludzka, jak każda populacja zwierząt, poddaje się doborowi naturalnemu, a populacja ludzka dodatkowo doborowi faworyzującemu konkretne cechy fenotypowe (m.in. ilość i lokalizację tkanki tłuszczowej). W historii ludzkości mamy różne okresy, w których faworyzowane były osoby z otyłością, co sugerowało zamożność. Bardzo możliwe, że te okresy wpłynęły na wytworzenie tzw. linii ewolucyjnej mtDNA, która spowodowała duże zróżnicowanie genetyczne wśród osób z otyłością, a mniejsze u osób z prawidłową masą ciała.

Następnym celem niniejszej pracy, było poszukiwanie zależności genetycznych genu MT-ATP6 mtDNA a fenotypami rozmieszczenia tkanki tłuszczowej brzusznej (TOFI; FOTI). Fenotyp TOFI charakteryzuje się podwyższoną zawartością trzewnej tkanki tłuszczowej oraz zmniejszeniem - podskórnej. Występowanie tego fenotypu tkanki tłuszczowej w otyłości wiąże się ze zmniejszoną wydolnością fizyczną i niższą wrażliwością na insulinę oraz zwiększoną aterogennością profilu lipidowego i wyższym ryzykiem wystąpienia niealkoholowego stłuszczenia wątroby. Fenotyp TOFI może również występować u osób z prawidłową masą ciała i wówczas predysponuje do rozwoju zespołu metabolicznej otyłości z prawidłową masą ciała (MONW) (106). Masa ciała pacjentów z zespołem MONW mieści się w zakresie normy, ale zaobserwowano u nich zwiększony obwód talii. Jest to związane z nieprawidłowym składem ciała, którego dysproporcja polega na znacznie zwiększonej zawartości tkanki tłuszczowej trzewnej i niskiej beztłuszczowej masie ciała. Prowadzi to do rozwoju zaburzeń metabolicznych, typowych dla otyłości, takich jak: insulinooporność, wysokie stężenie

triglicerydów i niskie – frakcji HDL cholesterolu oraz podwyższonego poziomu biomarkerów zapalnych, a także do wystąpienia chorób, rozwijających się na podłożu tych zaburzeń (132). Drugi fenotyp otyłości FOTI cechuje się dużym nagromadzeniem tkanki podskórnej, a niewielkim – trzewnej. Wiąże się on z nadmierną masą ciała u pacjenta, pomimo której nie występują zaburzenia metaboliczne (106).

Zaburzenia i choroby metaboliczne u osób z TOFI nie są uwarunkowane jedynie przez czynniki związane z tym fenotypem otyłości, ale są także następstwem nieprawidłowego sposobu żywienia oraz niewłaściwego stylu życia. Przykładem jest zmniejszona wrażliwość na insulinę, do której predysponuje fenotyp TOFI, ale również siedzący tryb życia. Natomiast odpowiednie żywienie i odpowiednia aktywność fizyczna, może przyczynić się do zwiększenia wrażliwości na insulinę. Rola diety u osób z fenotypem TOFI jest szczególnie istotna, ponieważ te osoby są grupą zwiększonego ryzyka rozwoju chorób metabolicznych (106).

Jest kilka metod określania fenotypu TOFI, ale jedną z najdokładniejszych jest tomografia komputerowa, ponieważ umożliwia oszacowanie występowania tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej w całym ludzkim organizmie (106). Innymi uznanymi metodami jest metoda DXA oraz rezonans magnetyczny, jednak są to metody drogie i wciąż wykorzystywane jedynie w celach naukowych. Dlatego w niniejszej pracy do wyznaczenia osób z brzuszным rozmieszczeniem tkanki tłuszczowej typu TOFI oraz FOTI użyto metody bioimpedancji, skanując tkankę tłuszczową na wysokości pasa. Następnie określano wskaźnik oszacowanego pola tkanki tłuszczowej trzewnej względem pola tkanki tłuszczowej podskórnej (VAT/SAT ratio).

W niniejszym badaniu większość pacjentów reprezentowała fenotyp TOFI (występował on u 96% kobiet z otyłością i 100% mężczyzn oraz aż u 81% kobiet z prawidłową masą ciała i 90% mężczyzn z grupy kontrolnej), co wskazywało na dużą zawartość w ich ustroju tkanki tłuszczowej trzewnej. Nieprawidłowości związane z dystrybucją tkanki tłuszczowej są kluczowym elementem diagnostycznym, a rozwój zaburzeń metabolicznych wzrasta przy nadmiernej zawartości wisceralnej tkanki tłuszczowej. Kiedy SAT wyczerpuje swoje możliwości magazynujące, tj. rozrasta się do maksymalnych rozmiarów (zawartość podskórnej tkanki tłuszczowej przekracza wartość 120 cm^2)(108), TG są magazynowane w VAT, co powoduje jej dalszy rozrost (85). W literaturze podawane są również inne fenotypy rozmieszczenia tkanki tłuszczowej w ustroju i oprócz fenotypów TOFI i FOTI występują fenotypy FOFI (fat outside, fat inside; otyły na zewnątrz, otyły w środku) oraz TOTI (thin outside, thin inside; chudy na zewnątrz, chudy wewnątrz) (94). Jednak, na obecną chwilę, nie podano standardów wyróżniania tych fenotypów. W niniejszym badaniu, u części pacjentów

VAT/SAT ratio było bliskie jedności, co utrudniało sklasyfikowanie ich do fenotypu TOFI lub FOTI. Tacy pacjenci występowały w obu grupach i mogli być fenotypem FOFI albo TOTI. Przyjęto jednak klasyfikację fenotypu TOFI, gdy VAT/SAT ratio był większy niż 1, natomiast gdy wskaźnik VAT/SAT ratio był mniejszy bądź równy 1, klasyfikowano do fenotypu FOTI.

Stwierdzono, że wśród fenotypów TOFI najliczniejszymi haplotypami był H1 występujący u 36,2% osób z tym fenotypem oraz haplotyp H6 występujący u 11,2% osób (był reprezentowany tylko wśród fenotypu TOFI). Zaobserwowano, że haplotypami reprezentatywnymi dla fenotypu FOTI były H24, H33, H35, H40, H42, H49 i H50. Charakterystyczne haplotypy dla osób z TOFI oraz FOTI, które zostały przedstawione, mogą również potwierdzać wcześniejszą teorię o linii ewolucyjnej i doborze faworyzującym. Pomimo stopniowego usuwania cech takich jak lepsze wydatkowanie energetyczne z populacji ludzkiej, zachowały się linie w mtDNA, które historycznie charakteryzowały się lepszą przemianą metaboliczną. Jednak ze względu na małą ilość pacjentów z fenotypem FOTI, nie ma możliwości szczegółowo sprecyzować czy genetycznie jest to istotne.

Podsumowując, gen MT-ATP6 kodujący syntazę ATP posiada kilka haplotypów/wersji nawet w tak małej populacji jak populacja regionalna. Pomimo braku zróżnicowania gałęzi w drzewie filogenetycznym i braku zróżnicowania w statystyce F, sieć haplotypów wykazała istotne różnice w kodzie genetycznym MT-ATP6. Historyczny zarys zróżnicowania genetycznego w mtDNA nie wykazał znaczących różnic pomiędzy pacjentami oraz pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Historyczny dobór faworyzujący i adaptacje do nowych warunków żywieniowych prawdopodobnie wyparły osoby bez predyspozycji do otyłości. Praktyczny brak różnic genetycznych w mtDNA, sugeruje, że populacja ludzka jest podatna na otyłość. Mimo tego, sieć haplotypów ukazuje linie, które się różnią od głównych węzłów, co może pokazywać, że w populacji są jeszcze osoby należące do linii z lepszym wydatkowaniem energii. Fakt ten może potwierdzić bardzo mały procentowy udział osób z fenotypem FOTI wśród pacjentów zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. Aby sprawdzić, jak mutacje wpływają na kodowane białka i ich funkcje, potrzebne są również badania oksygraficzne, badania tempa metabolizmu podstawowego (BMR – *ang.* basal metabolic rate) czy zbadanie ekspresji genu w odpowiednich tkankach tłuszczowych, oczywiście zachowując podział na haplotypy. Wprowadzenie haplotypów czy przynależności do linii ewolucyjnej jako markerów predyspozycji do występowania otyłości (gdzie obecnie koszt badania sekwencji jest bardzo przystępny dla pacjentów) oraz określenie fenotypów TOFI lub FOTI, pozwoliłoby na wprowadzenie odpowiedniej profilaktyki otyłości.

5.2. Polimorfizmy genu SCD a gospodarka węglowodanowa i lipidowa badanych osób

SCD koduje desaturazę zlokalizowaną w błonie retikulum endoplazmatycznego, która przede wszystkim przeprowadza desaturację kwasu palmitynowego do kwasu palmitoleinowego, kwasu stearynowego do kwasu oleinowego, zwiększając w ten sposób stosunek jednonienasyconych kwasów tłuszczowych do nasyconych kwasów tłuszczowych. U bydła, badania wykazały powiązania między tym genem, a składem kwasów tłuszczowych zarówno w mięsie, jak i w mleku (133, 134). Badania wykazały, że ekspresja genu SCD jest regulowana dietą, zwłaszcza wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi z rodziny n-6 i n-3, ale także hormonami i czynnikami środowiskowymi (65).

Do tej pory zidentyfikowano cztery izoformy SCD myszy (1–4) i dwie izoformy ludzkie (1 i 5). U myszy SCD1 ulega wszechobecnej ekspresji i wykazuje wyższą ekspresję w tkankach metabolicznych. Podobnie jak SCD1, SCD2 jest wszechobecny w większości tkanek z wyjątkiem wątroby dorosłych myszy. Mysi SCD3 ulega ekspresji głównie w gruczole Hardera, gruczole napletkowym oraz w dojrzałych gruczołach łojowych skóry (135), podczas gdy izoforma SCD4 ulega ekspresji głównie w sercu (65). Podobnie jak myszy SCD1, ludzki SCD1 jest poddawany ekspresji w tkankach lipogenicznych, podczas gdy ludzki SCD5 ma ekspresję w mózgu i trzustce (136). Gen SCD ulega silnej ekspresji w wątrobie i tkance tłuszczowej i koduje enzym retikulum endoplazmatycznego, SCD1 (137). SCD1 jest enzymem ograniczającym szybkość, który katalizuje biosyntezę nasyconych kwasów tłuszczowych palmitynowego i stearynowego do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, odpowiednio palmitoleinowego i oleinowego (138). MUFA są składnikami triglicerydów, ponieważ prawdopodobnie są wytwarzane w pobliżu enzymu acylotransferazy diacyloglicerolu (139). W związku z tym sugeruje się, że podwyższona aktywność genu SCD1 w wątrobie może powodować nadmierne odkładanie się triglicerydów, co następnie wywołałoby u części ludzi rozwój stłuszczenia wątroby (77). Ponadto dodatkowe triglicerydy mogą być wchłaniane przez cząsteczki lipoprotein o bardzo małej gęstości i przenoszone do tkanki tłuszczowej i innych miejsc, co może przyczynić się do wystąpienia otyłości (137). Te dwa mechanizmy zostały powiązane z opornością na insulinę (140). Dodatkowo zmniejszoną aktywność SCD1 przypisywano zwiększonej ekspresji genów zaangażowanych w β -oksydację kwasów tłuszczowych i zmniejszonej ekspresji genów zaangażowanych w syntezę kwasów tłuszczowych (141). Rzeczywiście, badania wykazały, że myszy ze spontaniczną lub celowaną delecją genu SCD1 są chronione przed hipertriglicydemią (65), stłuszczeniem wątroby (65, 84), otyłością (79, 141) i opornością na insulinę (86). Z drugiej strony istnieją dowody na to, że podwyższona aktywność SCD1 może zapewniać obronę przed lipoapoptozą,

stłuszczeniowym zapaleniem wątroby i ogólnoustrojowym stanem zapalnym (77, 85). Dlatego wydaje się, że SCD1 odgrywa podstawową aktywność funkcjonalną w pojawianiu się metabolicznych czynników ryzyka dla cukrzycy typu 2, takich jak otyłość, stłuszczenie wątroby, czy wysokie stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy (137). Mimo że SCD1 jest obiektem zainteresowania naukowców, to dotychczas pozwoliło to na poznanie mechanizmów jego funkcjonowania na modelach mysich (137). Jednak, niektóre badania na ludziach dostarczyły danych o jego funkcji i zasugerowały, że podwyższenie SCD1 może być związane z negatywnymi konsekwencjami, w tym zwiększonymi stężeniami triglicerydów w osoczu, stłuszczeniem niealkoholowym wątroby (142, 143), otyłością i cukrzycą typu 2 (144, 145). Jednak wcześniejsze badania nad zmiennością genu SCD1 pochodziły z różnych populacji, w tym z Wielkiej Brytanii, Szwecji, Hiszpanii, Niemiec, Bangladeszu i Kostaryki. Chociaż badania te wykazały, że indywidualna podatność na cukrzycę typu 2 była związana z polimorfizmami w ludzkim genie SCD1, to ich wyniki były niespójne (146). To badania mysich modeli SCD1 lub preadipocytów 3T3-L1 ujawniły, że SCD1 jest kluczowym regulatorem metabolizmu glukozy i lipidów w tkance tłuszczowej. Tkanka tłuszczowa może przyczyniać się do powstawania zaburzeń metabolicznych. Natomiast ekspresja genu SCD1 obniżała stężenie FFA w osoczu i uwrażliwiała tkanki na insulinę, przez co umożliwiała zmniejszenie masy ciała. Zmniejszenie ekspresji SCD1 powodowało znaczne zmiany w produkowanych białkach sekrecyjnych pochodzących z tkanki tłuszczowej, m.in. adiponektyny (147). Delecja SCD1 w tkankach zwiększała ekspresję adiponektyny w WAT i jej stężenia w osoczu (147). Natomiast u myszy wykazano, że adiponektyna zmniejsza lipogenezę w wątrobie i łagodzi hiperlipidemię (75, 148). Fakt, że receptory adiponektyny 1 i 2 ulegają ekspresji w wątrobie sugeruje, że adiponektyna może przyczyniać się do negatywnego wpływu niedoboru SCD1 na lipogenezę wątrobową u myszy SCD1 GKO (147). Jednak wymagane są dalsze badania, aby zrozumieć udział adiponektyny w osoczu w zmniejszeniu lipogenezы wątrobowej u tych myszy. Zgodnie ze znaczącą rolą nienasyconych kwasów tłuszczowych w regulacji metabolizmu glukozy, dotychczas opisano, że oleinian może przyczyniać się do oporności na insulinę poprzez hamowanie ekspresji białka transportera glukozy 4 (GLUT4) i transportera glukozy 2 (GLUT2) odpowiednio w komórkach mięśni szkieletowych i wątrobie. Osoby z wyższym wskaźnikiem desaturacji białka SCD oraz stosunkiem MUFA do SFA w tkance tłuszczowej, są bardziej narażone na rozwój insulinooporności (147). Wykazano, że obniżone stężenie MUFA w odpowiedzi na delecję SCD1 w tkankach zwiększa wrażliwość na insulinę i wykazuje zwiększone wykorzystanie glukozy. Podobnie do fenotypu obserwowanego w mięśniach szkieletowych, myszy z

niedoborem SCD1 wykazywały zwiększony wychwyt glukozy i sygnalizację insulinową w brązowej tkance tłuszczowej (BAT) wraz ze wzrostem ekspresji GLUT4 (82). Zwiększone wykorzystanie glukozy zwiększyło akumulację glikogenu w BAT myszy SCD1 GKO. Ponadto zwiększoną ekspresję GLUT4 odnotowano również w WAT myszy SCD1 GKO (147). Na podstawie tych badań stwierdzono, że obniżone stężenia MUFA i zwiększona sygnalizacja insuliny w tkankach obwodowych myszy GKO są pośredniczone przez regulację w dół PTP1B (białkowa fosfataza tyrozynowa 1B). Następnie aktywowana sygnalizacja insuliny prowadzi do zwiększonego wychwytu glukozy za pośrednictwem GLUT4 w tkankach obwodowych. Chociaż te odkrycia pokazują wpływ braku knockout'u SCD1 na metabolizm glukozy w tkankach obwodowych, badania te przeprowadzono na modelu mysim, w którym SCD1 został usunięty ze wszystkich tkanek, a względny udział SCD1 z poszczególnych tkanek w tych fenotypach nie jest w pełni zrozumiały (ze względu na zróżnicowaną ekspresję i działania w różnych tkankach). Ponadto, do wyjaśnienia pozostało, czy te fenotypy były spowodowane delecją SCD1 w tej samej tkance, czy w odległych tkankach (75). Wydaje się jednak, że hamowanie SCD1 zwiększa lokalny wychwyt glukozy przez GLUT1. W preadipocytach 3T3-L1 hamowanie aktywności SCD1 zwiększa ekspresję GLUT1 i wychwyt glukozy (147). Lokalny wpływ zmniejszonej aktywności SCD1 na ekspresję GLUT1 jest dodatkowo potwierdzony w tkance tłuszczowej myszy SCD1 KO (AKO), które wykazały zwiększoną ekspresję GLUT1, ale nie GLUT4. Należałoby podkreślić, że leczenie inhibitorem SCD nie wykazało wpływu na sygnalizację insulinową w komórkach 3T3-L1, co sugeruje, że hamowanie aktywności SCD1 indukuje ekspresję GLUT1 i wychwyt glukozy w preadipocytach 3T3-L1 niezależnie od sygnalizacji insulinowej (147). W przeciwieństwie do myszy SCD1 GKO, które wykazywały zwiększoną ekspresję adiponektyny w WAT i zwiększone stężenia adiponektyny w osoczu, myszy AKO wykazywały znaczną redukcję adiponektyny w osoczu. Podobnie komórki 3T3-L1 traktowane inhibitorem SCD wykazywały zmniejszoną ekspresję adiponektyny. Delecja w tkance tłuszczowej genu SCD1 zwiększała ekspresję GLUT1 w WAT myszy SCD1 AKO. Jednak zwiększony GLUT4 w WAT myszy SCD1 GKO sugeruje, że niedobór SCD1 w odległych tkankach może wpływać na WAT w sposób, który przeciwstawia się lokalnemu efektowi niedoboru SCD1 (147).

W mysich modelach otyłości udział nienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance tłuszczowej koreluje z większą masą tłuszczową (80). Natomiast obniżenie stężenia MUFA u myszy z niedoborem SCD1 upośledzały wątrobową biosyntezę TG i cholesterolu (84). Konsekwentnie, badania komórek 3T3-L1 traktowanych inhibitorem SCD dodatkowo potwierdziły ważną rolę SCD1 w regulacji tkanki tłuszczowej. Podczas różnicowania

preadipocytów zwiększa się całkowita zawartość lipidów komórkowych, a także poszczególnych frakcji lipidów, w tym TG, fosfolipidów i cholesterolu (149). Wykazano, że akumulacja lipidów komórkowych podczas procesu różnicowania jest zmniejszona w preadipocytach 3T3-L1 traktowanych inhibitorem SCD. Zmniejszenie to przypisuje się głównie zmniejszonej zawartości TG (149). W innych badaniach stwierdzono, że hamowanie aktywności SCD1 w różnicowaniu preadipocytów 3T3-L1 obniżało ekspresję genów zaangażowanych w biosyntezę TG. Ponadto hamowanie SCD1 skutkowało zwiększeniem stężeń SFA, palmitynianu i stearynianu, w różnych rodzajach lipidów w dojrzałych adipocytach 3T3-L1(149). Wiadomym jest, że SFA wolniej poddają się estryfikacji w porównaniu z MUFA (139). Natomiast, wpływ zmniejszonej ekspresji genu SCD1 w modelach *in vivo* na myszy SCD1 GKO wykazywał indukcję lipogenezy *de novo* w tkance tłuszczowej bez znaczącej zmiany w ekspresji genów lipogenicznych (150). Można wnioskować, że tkankowy efekt niedoboru SCD1 prowadzi do zmniejszenia lipogenezy, co zaobserwowano w wątrobie myszy LKO (bez knockoutu) i komórkach preadipocytów 3T3-L1 (84). Jednak indukowana lipogeneza w WAT myszy SCD1 GKO i jej supresja przez oleinian u myszy GLS5 sugeruje, że lipogeneza *de novo* w WAT jest regulowana głównie przez oleinian pochodzący z wątroby (150). Jest to widoczne u myszy LKO, u których niedobór SCD1 w wątrobie zmniejszał masę tkanki tłuszczowej, pomimo nienaruszonej ekspresji SCD1 w tkance tłuszczowej.

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) to jednozasadowa zmienność DNA, która występuje w określonej pozycji w genomie (151). W porównaniu z prostymi powtórzeniami sekwencji (mikrosatelity), SNP są najbardziej rozpowszechnioną i stabilną odmianą genetyczną w genomach (152). Szerokie występowanie SNP w genie lub w regionie regulatorowym ogólnie działa jako biologiczne markery dla zidentyfikowanych genów związanych z ważnymi cechami (152). W jednym z pierwszych badań wariantów genu SCD u ludzi zidentyfikowano związek między SNP rs1502593 a występowaniem zespołu metabolicznego w populacji dorosłych Kostaryki (145), gdzie osoby będące nosicielami mniejszego allelu (CT lub TT) miały większą częstość występowania ZM niż osoby z bardziej powszechnym genotypem CC. W tym samym badaniu u kobiet zaobserwowano również słaby, specyficzny dla płci związek między rs1502593, a stężeniami glukozy we krwi na czczo. Osobno Warensjö i in. (153) odkryli, że allel innego SNP SCD (rs7849) był związany z 23% wyższą wrażliwością na insulinę w porównaniu z częściej występującym allelem w badaniach wśród populacji Szwedzkiej. Martín-Núñez i in. (146) zmierzili skład fosfolipidów oraz stężenia FA w surowicy i genotypowali dziewięć SNP w SCD u ponad 800 dorosłych mężczyzn i kobiet w Hiszpanii. Kilka SNP (rs508384, rs2167444 i rs7849) w SCD było powiązanych ze

wskaźnikami desaturacji kwasów tłuszczowych, co sugeruje, że polimorfizmy mogą wpływać na aktywność SCD.

W niniejszym badaniu kolejnym celem było określenie występowania alleli w SNP rs7849 u osób z różnym stanem odżywienia (określanym na podstawie BMI), gdzie 75 osób stanowiło grupę badaną (w tym 46 kobiet oraz 29 mężczyzn z otyłością), a grupę kontrolną stanowiły osoby z prawidłową masą ciała w ilości 41 osób w tym (31 kobiet i 10 mężczyzn).

Stwierdzono, że we fragmencie genu SCD zawierającego SNP rs7849, najwięcej było homozygot TT (u 81,3% osób z otyłością i u 44% osób z prawidłową masą ciała). Natomiast homozygoty CC występowały jedynie u 7% osób grupy kontrolnej. Heterozygoty TC stwierdzono u 18,7% osób z otyłością i 49% z prawidłową masą ciała.

Częściej obserwowano osoby z allelem C (heterozygoty TC) wśród pacjentów z prawidłową masą ciała. Natomiast homozygoty CC zostały znalezione tylko i wyłącznie wśród pacjentów z prawidłową masą ciała. W niniejszych badaniach, podczas analizy występowania wariantów alleli SNP rs7849 wśród fenotypów TOFI i FOTI, stwierdzono że większy odsetek osób z allelem C obserwowany jest wśród osób z prawidłową masą ciała (heterozygoty TC 35,6%, n=15 vs. 17,4%, n=13 u osób z otyłością), ale prezentujących fenotyp TOFI. Również wszystkie homozygoty CC (7,3%, n=3 osób z prawidłową masą ciała) reprezentowały fenotyp TOFI, gdzie można byłoby się spodziewać większego efektu działania allelu C. Wśród fenotypów FOTI zaobserwowano 1,3% osób heterozygotycznych z otyłością (n=1) oraz 12,2% osób z prawidłową masą ciała (n=5).

W badaniach Martinez-Nunez (146) wykazano związek pomiędzy SNP rs7849 a występowaniem otyłości. Osoby u których występowało podstawienie nukleotydowe T>C wykazywały się mniejszym ryzykiem wystąpienia otyłości (146). W badaniach Martinez-Nunez i in. stwierdzono częstsze występowanie mutacji rs7849 wśród osób z prawidłową masą ciała, choć mutacja ta występowała również wśród osób z otyłością. Natomiast, homozygoty CC występowało tylko i wyłącznie wśród osób z prawidłową masą ciała (146). Podobne wyniki zatem uzyskano w przeprowadzonych tutaj badaniach.

W niniejszych badaniach wykazano, że osoby posiadające allel C (TC, CC) charakteryzowały się niezależnie od stopnia odżywienia istotnie niższymi parametrami stężenia glukozy, insuliny oraz istotnie niższym wskaźnikiem HOMA-IR (mediana 1,20 vs. 2,59 – u homozygot TT). Następnie sprawdzono czy posiadanie wariantu allelu C (TC, CC) wpływa na gospodarkę węglowodanową w zależności od stopnia odżywienia i stwierdzono, że u osób z otyłością i wariantem allelu C są istotnie niższe wartości badanych parametrów gospodarki węglowodanowej, a wskaźnik HOMA-IR był istotnie wyższy u osób homozygotycznych TT i

wynosił 3,09 vs. 1,30. Dodatkowo zaobserwowano niższe mediany stężenia glukozy (88,50 vs. 92,50 mg/dl) i insuliny na czczo (5,60 vs. 8,20 μ U/ml) u osób z prawidłową masą ciała i allelem C (TC,CC) niż homozygot TT. Sugeruje to, że osoby z mutacją w SNP rs7849 posiadają lepsze parametry gospodarki węglowodanowej, a co za tym idzie, może to u nich zmniejszać potencjalne zagrożenie powikłaniami w postaci cukrzycy typu 2 czy występowaniem zespołu metabolicznego. Badania, pod kątem wrażliwości na insulinę pokrywają się z badaniami Warensjo i Martin-Nunez (146, 153), jak i również rzucają nowe światło na inne parametry takie jak gospodarka lipidowa, która jest związana z otyłością i współtowarzyszącymi jej schorzeniami.

W niniejszych badaniach sprawdzono również wpływ występowania allelu C (TC, CC) na gospodarkę lipidową i wykazano, że posiadający ten allel mieli istotnie niższe stężenia cholesterolu LDL (104,00 vs. 119,00 mg/dl) niż homozygoty TT, podobnie obserwowano niższe stężenia triglicerydów (78,00 vs. 108,0 mg/dl), natomiast wyższe stężenia cholesterolu HDL (60,0 vs. 48,0 mg/dl). Analizując wpływ obecności allelu C na gospodarkę lipidową w zależności od stopnia odżywienia badanych, stwierdzono że u osób z otyłością nie było różnic istotnych statystycznie w stężeniach cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i triglicerydów względem osób posiadających allel TT, natomiast różnili się oni istotnie statystycznie wyższą medianą cholesterolu HDL (54,0 vs. 47,0 mg/dl; $p=0,0421$). Natomiast w grupie pacjentów z prawidłową masą ciała posiadacze allelu C nie różnili się istotnie od pacjentów z allelem TT pod względem badanych parametrów gospodarki lipidowej.

W badaniach Bhomwik i in. (137) stwierdzono wyższe stężenie glukozy we krwi na czczo jak i również po posiłku w całej badanej grupie (137). W badaniach Warensjö i in. (153) badano tylko i wyłącznie homozygoty. Bhomwik i in. powołują się, że zostały przebadane tylko i wyłącznie heterozygoty TC, przez co uzyskali inne wyniki niż Warensjö i in. . Przeprowadzone tutaj badania ukazują, że niezależnie czy homozygota CC czy heterozygota TC, wystąpienie allelu w SNP rs7849 sprzyja zmianom w parametrach takich jak stężenie glukozy, insuliny, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL oraz cholesterolu całkowitego. Dodatkowo również insulinowrażliwość na podstawie wyliczonego wskaźnika HOMA-IR jest wyższa u osób z występującym allelem C w SNP rs7849, w porównaniu do osób u których ten allel nie występuje. Nie jest wiadome, czy brak allelu C wpływa negatywnie na gospodarkę lipidową i węglowodanową, czy to jego obecność wpływa pozytywnie. Jak wspomniano wcześniej, delecja SCD u myszy skutkuje poprawą gospodarki węglowodanowej przy diecie HFD. Istnieje możliwość, że podstawienie T>C nie jest do końca synonimiczne, przez co wpływa na gorszą syntezę SFA do MUFA i odkładaniu się TG w tkankach obwodowych.

Dzięki temu jest lepszy przede wszystkim wychwytywanie glukozy, a gospodarka węglowodanowa nie pogarsza się. W momencie rozpatrywania oddzielnie grup (badana i kontrolna), okazało się, że brak obecności allelu C w SNP rs7849 pogarsza przede wszystkim gospodarkę węglowodanową, co potwierdzałoby teorię, że w obecności allelu C gospodarka węglowodanowa nie ulega pogorszeniu. Zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej różnice w stężeniach glukozy, insuliny oraz we wskaźniku HOMA-IR były istotne statystycznie, na niekorzyść osób bez allelu C (TT). W grupie badanej (osoby z otyłością), stężenie frakcji cholesterolu HDL było wyższe, co sugeruje, że osoby bez allelu C są bardziej narażone na konsekwencje metaboliczne związane z gospodarką lipidową. Jak wspomniano, wyniki z niniejszych badań są różne od badań Bhomwik i in. (137). Badania Bhomwik i in. zostały przeprowadzone w Bangladeszu. Bardzo możliwe, że allele SNP rs7849 są regulowane przez inne geny, które mogą być aktywne bądź nie w różnych populacjach, co by tłumaczyło pokrycie się wyników z wynikami Warensjo i in., którego zespół prowadził badania w Szwecji, czyli Europie. Niewiadomym jest, które warianty w SNP rs7849 są dominujące bądź recesywne. Biorąc pod uwagę częstość występowania heterozygot, a przede wszystkim frekwencję homozygot recesywnych, wariant C jest prawdopodobnie recesywny.

Wykryty SNP rs7849 w genie SCD, podobnie jak w badaniach innych populacji, ma swoje konsekwencje metaboliczne. Zarówno heterozygotyczni pacjenci TC jak i homozygotyczni CC charakteryzują się wyższą insulinowrażliwością, nawet pomimo otyłości. Brak obecności allelu C w SNP rs7849 genu SCD charakteryzuje się wyższymi medianami parametrów gospodarki węglowodanowej. Homozygoty CC występujące tylko i wyłącznie wśród grupy kontrolnej, mogą być niezwykle rzadkie, dlatego nie zostały znalezione w grupie badanej, lub homozygotyczność może potęgować efekt i występowanie ich jest ograniczone do osób z prawidłową masą ciała.

VI. Wnioski

1. Stwierdzono, że mimo małej zmienności genu MT-ATP6 u ludzi w zależności od stanu odżywienia (BMI), to jednak większą różnorodność haplotypów obserwowano u osób z otyłością
2. W badanej populacji pacjentów nie znaleziono zależności genetycznych w genie MT-ATP6 mtDNA charakterystycznych dla fenotypu rozmieszczenia brzusznej tkanki tłuszczowej TOFI oraz FOTI
3. Stwierdzono, że wśród badanych osób najczęściej obserwowano homozygoty TT SNP rs7849 genu SCD (81,3% osób z otyłością oraz 44% osób z prawidłową masą ciała), najmniejszy odsetek stanowiły osoby homozygotyczne CC (7%), natomiast wariant heterozygotyczny reprezentowany był u 18,7% osób z otyłością oraz 49% osób z prawidłową masą ciała.
4. Zaobserwowano, że u osób z fenotypem rozmieszczenia tkanki tłuszczowej brzusznej TOFI, homozygoty TT w SNP rs7849 genu SCD stanowiły 80% osób z otyłością i 40% osób z prawidłową masą ciała, homozygoty CC obserwowane były tylko u 7,3% osób z grupy z prawidłową masą ciała, a heterozygoty u 17,4% osób z otyłością i 35,6% osób z prawidłową masą ciała
5. Wśród badanych osób z otyłością, u których obserwowano brak obecności allelu C w SNP rs7849 genu SCD (homozygoty TT) stwierdzono istotnie wyższe mediany stężenia parametrów gospodarki węglowodanowej oraz istotnie niższą medianę stężenia cholesterolu HDL, natomiast wśród pacjentów z prawidłową masą ciała zaobserwowano istotnie wyższe mediany stężenia glukozy i insuliny na czczo.

VII. Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Badania epidemiologiczne dotyczące otyłości i nadwagi pokazują, iż jest to znaczący i wciąż rosnący problem osiągający status globalnej pandemii. Przyczynami wzrastającej liczby osób z otyłością są czynniki środowiskowe (nabyte), genetyczne (wrodzone), psychologiczne, endokrynologiczne i metaboliczne. Obecnie uważa się, że rola dziedziczenia predyspozycji do występowania nadmiernej masy ciała ma charakter wielogenowy. Szacuje się, że czynniki genetyczne odpowiadają za około 30–40% ryzyka wystąpienia otyłości. Pomimo szeroko zakrojonych badań nad genetycznymi podstawami otyłości dotychczas nie zidentyfikowano głównego genu/mutacji, który stanowiłby bezpośrednią przyczynę rozwoju tej choroby. Jako jeden z czynników wymienia się między innymi polimorfizm genu desaturazy steroilo-CoA (SCD). Jednakże zarówno funkcja tego genu, jak i związany z nim mechanizm indukcji otyłości jest obecnie nieznan. Podkreśla się też rolę pojedynczych polimorfizmów nukleotydowych DNA (SNP) w tym wpływ SNP'ów genu SCD. Dlatego też celem pracy było oszacowanie zmienności genu MT-ATP6 mtDNA oraz stopnia spokrewnienia u pacjentów z różnym stanem odżywienia (określanym na podstawie BMI) oraz fenotypami rozmieszczenia brzusznej tkanki tłuszczowej (TOFI, FOTI). Kolejnym celem było określenie występowania różnych alleli w SNP rs7849 genu SCD u osób z otyłością i prawidłową masą ciała oraz wpływu obecności allelu C na parametry gospodarki węglowodanowej i lipidowej w ustroju badanych osób.

Material i metody

Badanie obserwacyjne przeprowadzono wśród 116 osób (77 kobiet i 39 mężczyzn). Protokół badania został zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego (nr APK.002.407.2020, R-I-002/647/2019 oraz APK.002.39.2021). Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu przed jego rozpoczęciem. Uczestnikom wykonano badania antropometryczne (masa ciała, wzrost, oznaczono BMI kg/m^2). Pacjentów podzielono na grupę badaną (46 kobiet i 29 mężczyzn z BMI=30.0–39.9 kg/m^2) i kontrolną (31 kobiet i 10 mężczyzn z BMI=18.5–24.9 kg/m^2). Wszystkim osobom, biorącym udział w badaniu przeprowadzono analizę składu ciała metodą bioimpedancji elektrycznej oraz ocenę pola tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej przy użyciu aparatu BioScan 920-2. Na tej podstawie otrzymano następujące parametry: całkowitą zawartość tkanki tłuszczowej (kg, %) oraz zawartość tkanki pozatłuszczowej (kg). Ponadto oszacowano pole tkanki tłuszczowej podskórnej (cm^2) i trzewnej (cm^2) na wysokości pępka oraz ustalono stosunek VAT/SAT. Celem oznaczenia fenotypu rozmieszczenia brzusznej tkanki tłuszczowej (podskórnej oraz

trzewnej) TOFI (ang. thin outside fat inside) oraz FOTI (ang. fat inside thin outside) został wykorzystany wskaźnik VAT/SAT Ratio (ang. visceral adipose tissue/subcutaneous adipose tissue). Aby zbadać sekwencje genów został pobrany wymaz z jamy ustnej – z policzków oraz podniebienia – przy pomocy sterylnych zestawów wymazowych. Wyizolowane DNA użyto do reakcji PCR, a następnie powielone fragmenty zostały zsekwencjonowane metodą Sangera. Sekwencje przyrównano do siebie oraz poddano analizom bioinformatycznym. Następnie wykonano badania biochemiczne z krwi na czczo (stężenia glukozy, insuliny, cholesterolu całkowitego, frakcji LDL i HDL cholesterolu oraz triglicerydów) w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Wyniki dotyczące składu ciała, oznaczeń biochemicznych krwi wykonano z użyciem programu Statistica 13.3..

Wyniki

Badana grupa liczyła 75 osób (46 kobiet i 29 mężczyzn) z otyłością, natomiast grupa kontrolna stanowiła 41 osób (31 kobiet i 10 mężczyzn) z prawidłową masą ciała. Po odczytaniu sekwencji genu mtDNA MT-ATP6 ze wszystkich próbek wyróżniono 52 haplotypy. Najczęstszym był haplotyp H1, który był reprezentowany u 42 uczestników (29 z otyłością i 13 z prawidłową masą ciała). Drugim najczęstszym haplotypem był H6, reprezentowany u 13 uczestników (8 z otyłością i 5 z prawidłową masą ciała). Liczba haplotypów mtDNA MT-ATP6 w obu grupach była zróżnicowana, a każda grupa posiadała haplotypy charakterystyczne tylko dla niej. W grupie badanej były to haplotypy H3-H5, H7-H13 i H15-H31. W grupie kontrolnej były to haplotypy H33-H52. Wartości wariancji genetycznej F_{st} obliczone z obserwowanej zmienności MT-ATP6 nie były wysokie (0,0046), co w skali Wrighta wskazuje na bardzo niską zmienność genetyczną między grupami. Pomimo niskich wartości F_{st} , w sieci haplotypowej obserwowano nawet do 102 mutacji, a głównymi haplotypami były wcześniej wspomniane H1 i H6. W obu grupach większość pacjentów reprezentowało fenotyp TOFI, zdecydowanie mniej reprezentowało fenotyp FOTI.

Wśród pacjentów wykryto SNP rs7849 w genie SCD. Heterozygotyczność obserwowana dla homozygot TT wyniosła 0,681034483, a spodziewana 0,68489893, dla heterozygot TC heterozygotyczność obserwowana wyniosła 0,293103448, a spodziewana 0,299643282, natomiast dla homozygot CC heterozygotyczność obserwowana wyniosła 0,034482759 a spodziewana 0,032773484. We wszystkich przypadkach różnice nie były istotne statystycznie, zatem badana grupa pacjentów była w równowadze Hardy'ego-Winberg'a. Pacjentów heterozygotycznych – TC – zaobserwowano w obu grupach, natomiast pacjenci homozygotyczni CC występowali tylko w grupie kontrolnej (z prawidłową masą ciała). Zarówno wśród heterozygot jak i homozygot CC stwierdzono niższe mediany wskaźnika

HOMA-IR oraz niższe mediany stężeń: glukozy, insuliny, cholesterolu całkowitego, frakcji LDL cholesterolu i triglicerydów, a mediana stężeń frakcji HDL cholesterolu była istotnie wyższa.

Wnioski

Stwierdzono, że mimo małej zmienności genu MT-ATP6 u ludzi w zależności od stanu odżywienia (BMI), grupa badana charakteryzowała się większą różnorodnością haplotypową. Wśród wszystkich uczestników badania nie znaleziono zależności genetycznych w genie MT-ATP6 dla fenotypów TOFI i FOTI. Wśród badanych pacjentów obserwowano najczęściej homozygoty TT SNP rs7849 genu SCD (81,3% osób z otyłością oraz 44% osób z prawidłową masą ciała), najmniejszy odsetek stanowiły osoby homozygotyczne CC (7% osób z prawidłową masą ciała), a wariant heterozygotyczny obserwowany był u 18,7% osób z otyłością oraz 49% osób z prawidłową masą ciała. Wśród fenotypów TOFI i FOTI homozygoty TT stanowiły 80% osób z otyłością i 40% osób z prawidłową masą ciała, homozygoty CC obserwowane były tylko u 7,3% osób z prawidłową masą ciała, a heterozygoty u 17,4% osób z otyłością i 35,6% osób z prawidłową masą ciała. Pacjenci bez allelu C charakteryzowali się wyższymi medianami stężeń parametrów gospodarki węglowodanowej i niższą medianą stężeń cholesterolu HDL. Wśród pacjentów z grupy kontrolnej istotnie wyższe były parametry gospodarki węglowodanowej.

VIII. Streszczenie w języku angielskim

Introduction

Epidemiological studies on obesity and overweight indicate that it is a significant and continuously growing problem, reaching the status of a global pandemic. Environmental (acquired), genetic (inherited), psychological, endocrinological, and metabolic factors contribute to the increasing number of individuals with obesity. Currently, the inheritance of predisposition to excessive body weight is considered to have a polygenic nature. It is estimated that genetic factors account for about 30-40% of the risk of obesity. Despite extensive research on the genetic basis of obesity, the main gene/mutation that would directly cause the development of this disease has not been identified yet. One of the factors mentioned is the polymorphism of the stearoyl-CoA desaturase gene (SCD). However, both the function of this gene and the associated mechanism of obesity induction are currently unknown. The role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the SCD gene, including the impact of SNP alleles, is also emphasized. Therefore, the aim of the study was to estimate the variability of the MT-ATP6 mtDNA gene and the degree of relatedness among patients with different nutritional

states (based on BMI) and phenotypes of abdominal fat distribution (TOFI, FOTI). Another objective was to determine the occurrence of different alleles in the SNP rs7849 of the SCD gene in individuals with obesity and normal body weight, as well as the influence of the presence of the C allele on carbohydrate and lipid metabolism parameters in the studied individuals.

Material and methods

The observational study was conducted among 116 individuals (77 females and 39 males). The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the Medical University (Approval No. APK.002.407.2020, R-I-002/647/2019, and APK.002.39.2021). All participants provided informed, written consent to participate in the study prior to its commencement. Anthropometric measurements (body weight, height, and BMI in kg/m²) were performed on all participants. Patients were divided into the study group (46 females and 29 males with BMI = 30.0-39.9 kg/m²) and the control group (31 females and 10 males with BMI = 18.5-24.9 kg/m²). Body composition analysis using the bioelectrical impedance method and assessment of subcutaneous and visceral fat were conducted using the BioScan 920-2 device. The following parameters were obtained: total fat mass (kg, %) and non-fat tissue mass (kg). Additionally, subcutaneous (cm²) and visceral (cm²) fat areas at the level of the umbilicus were estimated, and the VAT/SAT ratio was determined. The VAT/SAT ratio (visceral adipose tissue/subcutaneous adipose tissue) was used to determine the phenotype of abdominal fat distribution (subcutaneous and visceral) as TOFI (thin outside fat inside) or FOTI (fat inside thin outside). To examine gene sequences, oral swabs were collected from the cheeks and palate using sterile swab kits. Isolated DNA was used for PCR reactions, and amplified fragments were subsequently sequenced using the Sanger method. The sequences were aligned and subjected to bioinformatic analyses. Biochemical blood tests (fasting glucose, insulin, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol fractions, and triglycerides) were performed at the Laboratory Diagnostic Department of the Medical University in Białystok. Results regarding body composition and biochemical blood markers were analyzed using the Statistica 13.3 software program.

Results

The study group consisted of 75 individuals (46 females and 29 males) with obesity, while the control group comprised 41 individuals (31 females and 10 males) with normal body weight. After sequencing the MT-ATP6 gene mtDNA from all samples, 52 haplotypes were identified. The most common haplotype was H1, represented by 42 participants (29 with obesity and 13 with normal body weight). The second most common haplotype was H6, represented by

13 participants (8 with obesity and 5 with normal body weight). The number of haplotypes in the MT-ATP6 gene in both groups was diverse, and each group had haplotypes unique to them. In the study group, these were haplotypes H3-H5, H7-H13, and H15-H31. In the control group, these were haplotypes H33-H52. The genetic variance values (F_{st}) calculated from the observed variability of MT-ATP6 were not high (0.0046), indicating very low genetic variability between the groups according to Wright's scale. Despite the low F_{st} values, the haplotype network revealed up to 102 mutations, with the main haplotypes being the aforementioned H1 and H6. In both groups, the majority of patients represented the TOFI phenotype, while the FOTI phenotype was less represented.

Among the patients, the SNP rs7849 in the SCD gene was detected. The observed heterozygosity for homozygous TT was 0.681034483, and the expected heterozygosity was 0.68489893. For heterozygous TC, the observed heterozygosity was 0.293103448, and the expected heterozygosity was 0.299643282. For homozygous CC, the observed heterozygosity was 0.034482759, and the expected heterozygosity was 0.032773484. In all cases, the differences were not statistically significant, indicating that the examined group of patients was in Hardy-Weinberg equilibrium. Heterozygous patients (TC) were observed in both groups, while homozygous CC patients were only present in the control group (with normal body weight). Both heterozygotes and homozygous CC individuals had lower median values of the HOMA-IR index, as well as lower median concentrations of glucose, insulin, total cholesterol, LDL cholesterol fractions, and triglycerides, while the median concentration of HDL cholesterol fractions was significantly higher.

Conclusions

It was found that despite the low variability of the MT-ATP6 gene in humans based on nutritional status (BMI), the study group exhibited greater haplotype diversity. Among all study participants, no genetic associations in the MT-ATP6 gene were found for the TOFI and FOTI phenotypes. Among the examined patients, homozygous TT for the rs7849 SNP in the SCD gene were most frequently observed (81.3% of individuals with obesity and 44% of individuals with normal body weight), while the smallest percentage consisted of homozygous CC individuals (7% of individuals with normal body weight), and the heterozygous variant was observed in 18.7% of individuals with obesity and 49% of individuals with normal body weight. Among the TOFI and FOTI phenotypes, homozygous TT individuals accounted for 80% of individuals with obesity and 40% of individuals with normal body weight, homozygous CC individuals were observed in only 7.3% of individuals with normal body weight, and heterozygotes in 17.4% of individuals with obesity and 35.6% of individuals with normal body

weight. Patients without the C allele had higher median concentrations of carbohydrate metabolism parameters and lower median concentrations of HDL cholesterol. Among patients in the control group, carbohydrate metabolism parameters were significantly higher.

XI. Wykaz piśmiennictwa

1. Society CotO. Obesity as a disease: the Obesity Society Council resolution. *Obesity* (Silver Spring). 2008;16(6):1151.
2. Organization WH. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva2009.
3. Yanovski JA. Obesity: Trends in underweight and obesity - scale of the problem. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(1):5-6.
4. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288-98.
5. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med*. 2017;376(3):254-66.
6. Murray S, Tulloch A, Gold MS, Avena NM. Hormonal and neural mechanisms of food reward, eating behaviour and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(9):540-52.
7. Farooqi IS. Defining the neural basis of appetite and obesity: from genes to behaviour. *Clin Med (Lond)*. 2014;14(3):286-9.
8. ANAND BK, BROBECK JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med*. 1951;24(2):123-40.
9. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
10. Coleman DL, Hummel KP. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol*. 1969;217(5):1298-304.
11. Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med*. 1990;322(21):1483-7.
12. Börjeson M. The aetiology of obesity in children. A study of 101 twin pairs. *Acta Paediatr Scand*. 1976;65(3):279-87.
13. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387(6636):903-8.
14. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 1999;341(12):879-84.
15. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998;392(6674):398-401.
16. Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, et al. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest*. 2000;106(2):271-9.
17. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 1998;19(2):155-7.
18. Hebebrand J, Volckmar AL, Knoll N, Hinney A. Chipping away the 'missing heritability': GIANT steps forward in the molecular elucidation of obesity - but still lots to go. *Obes Facts*. 2010;3(5):294-303.
19. Speliotes EK, Willer CJ, Berndt SI, Monda KL, Thorleifsson G, Jackson AU, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*. 2010;42(11):937-48.
20. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism*. 2019;92:6-10.
21. Global Obesity Observatory [Internet]. 2023. Available from: https://data.worldobesity.org/country/poland-173/#data_prevalence.

22. (NCD-RisC) NRFC. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017;390(10113):2627-42.
23. Czernichow S, Kengne AP, Stamatakis E, Hamer M, Batty GD. Body mass index, waist circumference and waist-hip ratio: which is the better discriminator of cardiovascular disease mortality risk?: evidence from an individual-participant meta-analysis of 82 864 participants from nine cohort studies. *Obes Rev*. 2011;12(9):680-7.
24. Preventing and Managing the Global Epidemic geneva [Internet]. World Health Organization. 1998.
25. Upadhyay J, Farr O, Perakakis N, Ghaly W, Mantzoros C. Obesity as a Disease. *Med Clin North Am*. 2018;102(1):13-33.
26. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH, Federation WO. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obes Rev*. 2017;18(7):715-23.
27. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378(9793):804-14.
28. Ladabaum U, Mannalithara A, Myer PA, Singh G. Obesity, abdominal obesity, physical activity, and caloric intake in US adults: 1988 to 2010. *Am J Med*. 2014;127(8):717-27.e12.
29. De Lorenzo A, Gratteri S, Gualtieri P, Cammarano A, Bertucci P, Di Renzo L. Why primary obesity is a disease? *J Transl Med*. 2019;17(1):169.
30. Kuhle S, Tong OS, Woolcott CG. Association between caesarean section and childhood obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2015;16(4):295-303.
31. Sinha A, Feinstein M. Epidemiology, pathophysiology, and prevention of heart failure in people with HIV. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020;63(2):134-41.
32. Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. *Physiol Rev*. 2018;98(4):1911-41.
33. Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet*. 1997;27(4):325-51.
34. Elks CE, den Hoed M, Zhao JH, Sharp SJ, Wareham NJ, Loos RJ, et al. Variability in the heritability of body mass index: a systematic review and meta-regression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:29.
35. Loos RJF, Yeo GSH. The genetics of obesity: from discovery to biology. *Nat Rev Genet*. 2022;23(2):120-33.
36. Saeed S, Arslan M, Froguel P. Genetics of Obesity in Consanguineous Populations: Toward Precision Medicine and the Discovery of Novel Obesity Genes. *Obesity (Silver Spring)*. 2018;26(3):474-84.
37. Chami N, Preuss M, Walker RW, Moscati A, Loos RJF. The role of polygenic susceptibility to obesity among carriers of pathogenic mutations in MC4R in the UK Biobank population. *PLoS Med*. 2020;17(7):e1003196.
38. Benzinou M, Chèvre JC, Ward KJ, Lecoœur C, Dina C, Lobbens S, et al. Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Hum Mol Genet*. 2008;17(13):1916-21.
39. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. 2006;14(4):529-644.
40. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*. 2007;316(5826):889-94.

41. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D1005-D12.
42. Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet.* 2009;41(1):25-34.
43. Singh K, Jayaram M, Kaare M, Leidmaa E, Jagomäe T, Heinla I, et al. Neural cell adhesion molecule *Negr1* deficiency in mouse results in structural brain endophenotypes and behavioral deviations related to psychiatric disorders. *Sci Rep.* 2019;9(1):5457.
44. Soni A, Amisten S, Rorsman P, Salehi A. GPRC5B a putative glutamate-receptor candidate is negative modulator of insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441(3):643-8.
45. Jarick I, Vogel CI, Scherag S, Schäfer H, Hebebrand J, Hinney A, et al. Novel common copy number variation for early onset extreme obesity on chromosome 11q11 identified by a genome-wide analysis. *Hum Mol Genet.* 2011;20(4):840-52.
46. Sainsbury A, Baldock PA, Schwarzer C, Ueno N, Enriquez RF, Couzens M, et al. Synergistic effects of Y2 and Y4 receptors on adiposity and bone mass revealed in double knockout mice. *Mol Cell Biol.* 2003;23(15):5225-33.
47. Falchi M, El-Sayed Moustafa JS, Takousis P, Pesce F, Bonnefond A, Andersson-Assarsson JC, et al. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity. *Nat Genet.* 2014;46(5):492-7.
48. Meisler MH, Ting CN. The remarkable evolutionary history of the human amylase genes. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(3-4):503-9.
49. Butler MG, Miller JL, Forster JL. Prader-Willi Syndrome - Clinical Genetics, Diagnosis and Treatment Approaches: An Update. *Curr Pediatr Rev.* 2019;15(4):207-44.
50. Holland AJ, Treasure J, Coskeran P, Dallow J, Milton N, Hillhouse E. Measurement of excessive appetite and metabolic changes in Prader-Willi syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1993;17(9):527-32.
51. Farag TI, Teebi AS. High incidence of Bardet Biedl syndrome among the Bedouin. *Clin Genet.* 1989;36(6):463-4.
52. Bahia L, Coutinho ES, Barufaldi LA, Abreu GeA, Malhão TA, de Souza CP, et al. The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system: cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2012;12:440.
53. Marshall JD, Bronson RT, Collin GB, Nordstrom AD, Maffei P, Paisey RB, et al. New Alström syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases. *Arch Intern Med.* 2005;165(6):675-83.
54. Cohen MM, Hall BD, Smith DW, Graham CB, Lampert KJ. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J Pediatr.* 1973;83(2):280-4.
55. Wang YQ, Zhang YQ, Zhang F, Zhang YW, Li R, Chen GX. Increased Eating Frequency Is Associated with Lower Obesity Risk, But Higher Energy Intake in Adults: A Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13(6).
56. Thomas EL, Frost G, Taylor-Robinson SD, Bell JD. Excess body fat in obese and normal-weight subjects. *Nutr Res Rev.* 2012;25(1):150-61.
57. Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:679-99.
58. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med (Berl).* 2010;88(10):993-1001.
59. Barrientos A, Casademont J, Cardellach F, Ardite E, Estivill X, Urbano-Márquez A, et al. Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of

- mitochondrial-encoded genes in the human aging process. *Biochem Mol Med.* 1997;62(2):165-71.
60. Lee HC, Lim ML, Lu CY, Liu VW, Fahn HJ, Zhang C, et al. Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging--smoking enhances oxidative stress on the aged tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1999;362(2):309-16.
61. De Naeyer H, Ouwens DM, Van Nieuwenhove Y, Pattyn P, 't Hart LM, Kaufman JM, et al. Combined gene and protein expression of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase, mitochondrial content, and adipocyte size in subcutaneous and visceral adipose tissue of morbidly obese men. *Obes Facts.* 2011;4(5):407-16.
62. Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(22):7815-20.
63. Igosheva N, Abramov AY, Poston L, Eckert JJ, Fleming TP, Duchon MR, et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *PLoS One.* 2010;5(4):e10074.
64. Shoar Z, Goldenthal MJ, De Luca F, Suarez E. Mitochondrial DNA content and function, childhood obesity, and insulin resistance. *Endocr Res.* 2016;41(1):49-56.
65. Miyazaki M, Jacobson MJ, Man WC, Cohen P, Asilmaz E, Friedman JM, et al. Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem.* 2003;278(36):33904-11.
66. Malik AN, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion.* 2013;13(5):481-92.
67. Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(5):446-52.
68. Yang TL, Guo Y, Shen H, Lei SF, Liu YJ, Li J, et al. Genetic association study of common mitochondrial variants on body fat mass. *PLoS One.* 2011;6(6):e21595.
69. Pichaud N, Ballard JW, Tanguay RM, Blier PU. Naturally occurring mitochondrial DNA haplotypes exhibit metabolic differences: insight into functional properties of mitochondria. *Evolution.* 2012;66(10):3189-97.
70. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
71. Demir D, Türkkahraman D, Aktaş Samur A, Lüleci G, Akçürin S, Alper Ö. Mitochondrial ATPase subunit 6 and cytochrome B gene variations in obese Turkish children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2014;6(4):209-15.
72. Carlini DB, Stephan W. In vivo introduction of unpreferred synonymous codons into the *Drosophila* Adh gene results in reduced levels of ADH protein. *Genetics.* 2003;163(1):239-43.
73. Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl(Suppl):S138-43.
74. Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(31):11245-50.
75. ALJohani AM, Syed DN, Ntambi JM. Insights into Stearoyl-CoA Desaturase-1 Regulation of Systemic Metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(12):831-42.
76. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8(11):1288-95.

77. Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 2011;13(4):376-88.
78. Hillgartner FB, Charron T. Arachidonate and medium-chain fatty acids inhibit transcription of the acetyl-CoA carboxylase gene in hepatocytes in culture. *J Lipid Res.* 1997;38(12):2548-57.
79. Sampath H, Ntambi JM. Role of stearoyl-CoA desaturase-1 in skin integrity and whole body energy balance. *J Biol Chem.* 2014;289(5):2482-8.
80. Yew Tan C, Virtue S, Murfitt S, Roberts LD, Phua YH, Dale M, et al. Adipose tissue fatty acid chain length and mono-unsaturation increases with obesity and insulin resistance. *Sci Rep.* 2015;5:18366.
81. Puri P, Wiest MM, Cheung O, Mirshahi F, Sargeant C, Min HK, et al. The plasma lipidomic signature of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2009;50(6):1827-38.
82. Rahman SM, Dobrzyn A, Lee SH, Dobrzyn P, Miyazaki M, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases insulin signaling and glycogen accumulation in brown adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(2):E381-7.
83. Dobrzyn P, Sampath H, Dobrzyn A, Miyazaki M, Ntambi JM. Loss of stearoyl-CoA desaturase 1 inhibits fatty acid oxidation and increases glucose utilization in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(2):E357-64.
84. Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Otselberger C, Liu X, et al. Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab.* 2007;6(6):484-96.
85. Liu L, Feng J, Zhang G, Yuan X, Li F, Yang T, et al. Visceral adipose tissue is more strongly associated with insulin resistance than subcutaneous adipose tissue in Chinese subjects with pre-diabetes. *Curr Med Res Opin.* 2018;34(1):123-9.
86. Flowers MT, Ade L, Strable MS, Ntambi JM. Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity. *J Lipid Res.* 2012;53(8):1646-53.
87. Sampath H, Flowers MT, Liu X, Paton CM, Sullivan R, Chu K, et al. Skin-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase-1 alters skin lipid composition and protects mice from high fat diet-induced obesity. *J Biol Chem.* 2009;284(30):19961-73.
88. Rogowski MP, Flowers MT, Stamatikos AD, Ntambi JM, Paton CM. SCD1 activity in muscle increases triglyceride PUFA content, exercise capacity, and PPAR δ expression in mice. *J Lipid Res.* 2013;54(10):2636-46.
89. Dobrzyn P, Pyrkowska A, Jazurek M, Szymanski K, Langfort J, Dobrzyn A. Endurance training-induced accumulation of muscle triglycerides is coupled to upregulation of stearoyl-CoA desaturase 1. *J Appl Physiol (1985).* 2010;109(6):1653-61.
90. Bednarski T, Olichwier A, Opasinska A, Pyrkowska A, Gan AM, Ntambi JM, et al. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency reduces lipid accumulation in the heart by activating lipolysis independently of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(12 Pt A):2029-37.
91. Matsui H, Yokoyama T, Sekiguchi K, Iijima D, Sunaga H, Maniwa M, et al. Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) augments saturated fatty acid-induced lipid accumulation and inhibits apoptosis in cardiac myocytes. *PLoS One.* 2012;7(3):e33283.
92. Cinti S. UCP1 protein: The molecular hub of adipose organ plasticity. *Biochimie.* 2017;134:71-6.
93. Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva ME. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(2):145-50.
94. Chaldakov GN. OBESITY: AN INSIDE VERSUS AN OUTSIDE VIEW. JIMMY BELL AND THE LITTLE PRINCE A SCIENCE-IN-FICTION DEDICATED

- TO WORLD OBESITY DAY 2017. Medical University of Varna: Scripta Scientifica Vox Studentium; 2018. p. 13-7.
95. Luis-Villaroya A, Espina L, García-Gonzalo D, Bayarri S, Pérez C, Pagán R. Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation. *Int J Food Microbiol.* 2015;205:90-7.
 96. Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab.* 2012;15(5):635-45.
 97. Gancheva S, Jelenik T, Álvarez-Hernández E, Roden M. Interorgan Metabolic Crosstalk in Human Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1371-415.
 98. Schoiswohl G, Stefanovic-Racic M, Menke MN, Wills RC, Surlow BA, Basantani MK, et al. Impact of Reduced ATGL-Mediated Adipocyte Lipolysis on Obesity-Associated Insulin Resistance and Inflammation in Male Mice. *Endocrinology.* 2015;156(10):3610-24.
 99. Luo W, Kim Y, Jensen ME, Herlea-Pana O, Wang W, Rudolph MC, et al. miR-130b/301b Is a Negative Regulator of Beige Adipogenesis and Energy Metabolism In Vitro and In Vivo. *Diabetes.* 2022;71(11):2360-71.
 100. von Essen G, Lindsund E, Cannon B, Nedergaard J. Adaptive facultative diet-induced thermogenesis in wild-type but not in UCP1-ablated mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2017;313(5):E515-E27.
 101. Cedikova M, Kripnerová M, Dvorakova J, Pitule P, Grundmanova M, Babuska V, et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* 2016;2016:6067349.
 102. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(5):R159-71.
 103. Whitehead A, Krause FN, Moran A, MacCannell ADV, Scragg JL, McNally BD, et al. Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis. *Nat Commun.* 2021;12(1):1905.
 104. Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000;5(2):165-85.
 105. Hardouin P, Rharass T, Lucas S. Bone Marrow Adipose Tissue: To Be or Not To Be a Typical Adipose Tissue? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:85.
 106. Zdrojewicz Z, Popowicz E, Szyca M, Michalik T, Śmieszniak B. TOFI phenotype - its effect on the occurrence of diabetes. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2017;23(2):96-100.
 107. Cembrowska P, Stefańska A, Odrowąż-Sypniewska G. Obesity phenotypes: normal-weight individuals with metabolic disorders versus metabolically healthy obese. *Medical Research Journal: Via Medica;* 2016. p. 95-9.
 108. Milewska M, Mioduszevska M, Pańczyk M, Kucharska A, Sińska B, Dąbrowska-Bender M, et al. [Two compartment model of body composition and abdominal fat area in postmenopausal women - pilot study]. *Wiad Lek.* 2016;69(2 Pt 2):169-73.
 109. Podręcznik użytkownika Maltron International Ltd BioScan 920.
 110. Mao GH, Wang YN, Xu M, Wang WL, Tan L, Tao SB. Polymorphisms in the MT-ATP6 and MT-CYB genes in in vitro fertilization failure. *Mitochondrial DNA.* 2015;26(1):20-4.
 111. Lundborg P, Nystedt P, Lindgren B. Getting ready for the marriage market? The association between divorce risks and investments in attractive body mass among married Europeans. *J Biosoc Sci.* 2007;39(4):531-44.
 112. McCabe MP, Mavoia H, Ricciardelli LA, Schultz JT, Waqa G, Fotu KF. Socio-cultural agents and their impact on body image and body change strategies among adolescents in Fiji, Tonga, Tongans in New Zealand and Australia. *Obes Rev.* 2011;12 Suppl 2:61-7.

113. Hayashi F, Takimoto H, Yoshita K, Yoshiike N. Perceived body size and desire for thinness of young Japanese women: a population-based survey. *Br J Nutr.* 2006;96(6):1154-62.
114. Hardin J, McLennan AK, Brewis A. Body size, body norms and some unintended consequences of obesity intervention in the Pacific islands. *Ann Hum Biol.* 2018;45(3):285-94.
115. Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. *Am J Public Health.* 2007;97(10):1808-12.
116. Mariapun J, Ng CW, Hairi NN. The Gradual Shift of Overweight, Obesity, and Abdominal Obesity Towards the Poor in a Multi-ethnic Developing Country: Findings From the Malaysian National Health and Morbidity Surveys. *J Epidemiol.* 2018;28(6):279-86.
117. Heiker JT, Kunath A, Kosacka J, Flehmig G, Knigge A, Kern M, et al. Identification of genetic loci associated with different responses to high-fat diet-induced obesity in C57BL/6N and C57BL/6J substrains. *Physiol Genomics.* 2014;46(11):377-84.
118. Ramos Salas X, Alberga AS, Cameron E, Estey L, Forhan M, Kirk SFL, et al. Addressing weight bias and discrimination: moving beyond raising awareness to creating change. *Obes Rev.* 2017;18(11):1323-35.
119. Sharma AM, Goodwin DL, Causgrove Dunn J. Conceptualizing Obesity as a Chronic Disease: An Interview With Dr. Arya Sharma. *Adapt Phys Activ Q.* 2018;35(3):285-92.
120. Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjölin E, Dahlman I, et al. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia.* 2007;50(12):2526-33.
121. Balfour JA, Plosker GL. Rosiglitazone. *Drugs.* 1999;57(6):921-30; discussion 31-2.
122. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest.* 2004;114(9):1281-9.
123. Sörbris R, Monti M, Nilsson-Ehle P, Wadsö I. Heat production by adipocytes from obese subjects before and after weight reduction. *Metabolism.* 1982;31(10):973-8.
124. Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes.* 2005;54(5):1392-9.
125. Dahlman I, Forsgren M, Sjögren A, Nordström EA, Kaaman M, Näslund E, et al. Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor- α . *Diabetes.* 2006;55(6):1792-9.
126. Boden G, Homko C, Mozzoli M, Showe LC, Nichols C, Cheung P. Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. *Diabetes.* 2005;54(3):880-5.
127. Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-van Hal N, et al. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia.* 2005;48(11):2365-75.
128. Liu N, Zhang K, Zhao H. Haplotype-association analysis. *Adv Genet.* 2008;60:335-405.
129. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2002;3(4):299-309.
130. Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Buchanan A, Stengård J, et al. Haplotype structure and population genetic inferences from nucleotide-sequence variation in human lipoprotein lipase. *Am J Hum Genet.* 1998;63(2):595-612.
131. Nordborg M, Tavaré S. Linkage disequilibrium: what history has to tell us. *Trends Genet.* 2002;18(2):83-90.

132. Pluta W, Dudzińska W, Lubkowska A. Metabolic Obesity in People with Normal Body Weight (MONW)-Review of Diagnostic Criteria. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(2).
133. Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, et al. Genotype of stearoyl-coA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm Genome*. 2004;15(2):142-8.
134. Moioli B, Contarini G, Avalli A, Catillo G, Orrù L, De Matteis G, et al. Short communication: Effect of stearoyl-coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of milk. *J Dairy Sci*. 2007;90(7):3553-8.
135. Zheng Y, Prouty SM, Harmon A, Sundberg JP, Stenn KS, Parimoo S. Scd3--a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. *Genomics*. 2001;71(2):182-91.
136. Castro LF, Wilson JM, Gonçalves O, Galante-Oliveira S, Rocha E, Cunha I. The evolutionary history of the stearoyl-CoA desaturase gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol*. 2011;11:132.
137. Mousumi B. C allele of SCD1 rs7849 (T/C) polymorphism and Susceptibility to Type 2 Diabetes: A pilot study from Bangladesh. *Research Square*2023.
138. Ntambi JM, Miyazaki M. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14(3):255-61.
139. Paton CM, Ntambi JM. Loss of stearoyl-CoA desaturase activity leads to free cholesterol synthesis through increased Xbp-1 splicing. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(6):E1066-75.
140. Petersen KF, Shulman GI. Etiology of insulin resistance. *Am J Med*. 2006;119(5 Suppl 1):S10-6.
141. MacDonald ML, van Eck M, Hildebrand RB, Wong BW, Bissada N, Ruddle P, et al. Despite antiatherogenic metabolic characteristics, SCD1-deficient mice have increased inflammation and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(3):341-7.
142. Petersson H, Basu S, Cederholm T, Risérus U. Serum fatty acid composition and indices of stearoyl-CoA desaturase activity are associated with systemic inflammation: longitudinal analyses in middle-aged men. *Br J Nutr*. 2008;99(6):1186-9.
143. Tomita K, Teratani T, Yokoyama H, Suzuki T, Irie R, Ebinuma H, et al. Plasma free myristic acid proportion is a predictor of nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci*. 2011;56(10):3045-52.
144. Kröger J, Zietemann V, Enzenbach C, Weikert C, Jansen EH, Döring F, et al. Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(1):127-42.
145. Gong J, Campos H, McGarvey S, Wu Z, Goldberg R, Baylin A. Adipose tissue palmitoleic acid and obesity in humans: does it behave as a lipokine? *Am J Clin Nutr*. 2011;93(1):186-91.
146. Martín-Núñez GM, Cabrera-Mulero R, Rojo-Martínez G, Gómez-Zumaquero JM, Chaves FJ, de Marco G, et al. Polymorphisms in the SCD1 gene are associated with indices of stearoyl CoA desaturase activity and obesity: a prospective study. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(12):2177-84.
147. Hyun CK, Kim ED, Flowers MT, Liu X, Kim E, Strable M, et al. Adipose-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase 1 up-regulates the glucose transporter GLUT1 in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(4):480-6.
148. Holland WL, Adams AC, Brozinick JT, Bui HH, Miyauchi Y, Kusminski CM, et al. An FGF21-adiponectin-ceramide axis controls energy expenditure and insulin action in mice. *Cell Metab*. 2013;17(5):790-7.

149. Ralston JC, Metherel AH, Stark KD, Mutch DM. SCD1 mediates the influence of exogenous saturated and monounsaturated fatty acids in adipocytes: Effects on cellular stress, inflammatory markers and fatty acid elongation. *J Nutr Biochem.* 2016;27:241-8.
150. Burhans MS, Hagman DK, Kuzma JN, Schmidt KA, Kratz M. Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Compr Physiol.* 2018;9(1):1-58.
151. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol.* 2002;34(3):275-305.
152. Zhang J, Yang J, Zhang L, Luo J, Zhao H, Wen C. A new SNP genotyping technology Target SNP-seq and its application in genetic analysis of cucumber varieties. *Sci Rep.* 2020;10(1):5623.
153. Warensjö E, Rosell M, Hellenius ML, Vessby B, De Faire U, Risérus U. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids Health Dis.* 2009;8:37.

X. Wykaz tabel

Tabela I. Podstawowe parametry antropometryczne kobiet obu badanych grup.....	s. 35
Tabela II. Podstawowe parametry antropometryczne mężczyzn obu badanych grup.....	s.36
Tabela III. Podstawowe parametry składu ciała wśród kobiet w obu badanych grupach.....	s.36
Tabela IV. Podstawowe parametry składu ciała wśród mężczyzn w obu badanych grupach.....	s.37
Tabela V. Liczba haplotypów wyodrębnionych w badanych grupach.....	s.38
Tabela VI. Podstawowe parametry opisujące zmienność w MT-ATP6.....	s.39
Tabela VII. Liczba haplotypów genu MT-ATP6 wśród fenotypów TOFI i FOTI.....	s.42
Tabela VIII. Wybrane parametry biochemiczne krwi na czczo wśród kobiet obu badanych grup.....	s.43
Tabela IX. Wybrane parametry biochemiczne krwi na czczo wśród mężczyzn obu badanych grup.....	s.44
Tabela X. Liczebność wariantów alleli wśród pacjentów obu badanych grup (kobiet i mężczyzn).....	s.44
Tabela XI. Liczebność wariantów alleli wśród fenotypów TOFI i FOTI z podziałem na grupę badaną i kontrolną (kobiet i mężczyzn).....	s.45
Tabela XII. Heterozygotyczność obserwowana (H_o) oraz heterozygotyczność spodziewana (H_e) wśród badanych pacjentów z podziałem na wariant allelu.	s.45
Tabela XIII. Różnice statystyczne pomiędzy allelami T i C a parametrami biochemicznymi w krwi w całej grupie (osób obu płci z otyłością i prawidłową masą ciała).....	s.46
Tabela XIV. Analiza posiadania allelu C jako czynnika wpływającego na stężenia wybranych parametrów biochemiczny krwi w całej grupie (osób z otyłością i prawidłową masą ciała, kobiet i mężczyzn).....	s.47
Tabela XV. Różnice statystyczne pomiędzy allelami T i C a parametrami biochemicznymi w krwi wewnątrz grupy pacjentów z otyłością (osób obu płci).....	s.47
Tabela XVI. Różnice statystyczne pomiędzy allelami T i C a parametrami biochemicznymi w krwi wewnątrz grupy pacjentów z prawidłową masą ciała (osób obu płci).....	s.48

XI. Wykaz rycin

- Rycina 1.** Sieć haplotypów genu MT-ATP6.....s.39
- Rycina 2.** Drzewo filogenetyczne N-J dla haplotypów MT-ATP6 mtDNA.....s.40
- Rycina 3.** Liczba fenotypów TOFI (A) i FOTI (B) w zależności od płci i stanu odżywienia...s.41

XII. Zgody Komisji Bioetycznej

**KOMISJA BIOETYCZNA PRZY
UNIwersYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 17.12.2020 r.

Uchwała nr: APK.002.407.2020

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Ocena wpływu zmienności SNP genu desaturazy stearoilo-CoA (SCD) jądrowego DNA i genu MT-ATP6 mitochondrialnego DNA oraz czynników środowiskowych na zmienność fenotypową tkanki tłuszczowej trzewnej oraz podskórnej” przez mgr Damiana Pogodzińskiego wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

KOMISJA BIOETYCZNA
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08
prorektorkl@umb.edu.pl

Białystok, 19-12-2019

Uchwała nr: R-I-002/647/2019

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Poszukiwanie markerów otyłości” przez prof. dr hab. Lucynę Ostrowską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

**KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 28.01.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.39.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Poszukiwanie markerów otyłości metabolicznej” przez prof. dr hab. Lucynę Ostrowską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 28.01.2021 r. do grudnia 2023 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Pouczenie:

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.