Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu

Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki

Analiza wpływu transporterów Pcft, Rfc, Dmt1, Tfr2 na gospodarkę folianami i żelazem

Rozprawa doktorska

mgr inż. Anna Maria Radziejewska

promotor: prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Agata Chmurzyńska

Poznań, 2021

Streszczenie

Prawidłowa ilość folianów i żelaza w organizmie jest istotna dla wielu aspektów zdrowia człowieka. Jednocześnie w wielu krajach na świecie stwierdzono niedostateczne spożycie tych mikroskładników, w szczególności w populacji młodych kobiet. Co jest istotne o tyle, że w przypadku zajścia w ciążę konsekwencje niedoboru folianów i żelaza mogą mieć wpływ na prawidłowy przebieg ciąży i rozwój płodu.

Biodostępność składników pokarmowych oraz ich wykorzystanie w komórkach zależą z jednej strony od interakcji pomiędzy składnikami żywności, a z drugiej strony od białek transportujących te składniki w jelicie i innych tkankach. Transporterami związanymi z absorpcją folianów jest m.in. transporter folianów sprzężony z protonem (PCFT, ang. *proton-coupled folate transporter*). Natomiast za transport folianów do komórek wątroby odpowiedzialny jest przenośnik zredukowanych folianów (RFC, ang. *reduced folate carrier*). Uważa się, że za wchłanianie żelaza w jelicie odpowiada głównie transporter metali dwuwartościowych (DMT1, ang. *divalent metal transporter 1*), z kolei za transport żelaza do wnętrza hepatocytów odpowiedzialny jest receptor transferryny 2 (TFR2, *ang. transferrin receptor 2*).

W związku z częstym jednoczesnym stosowaniem suplementów żelaza i kwasu foliowego (FA) ważne jest poznanie w jaki sposób wpływa to na parametry biochemiczne krwi. Wcześniejsze badania wykazywały zależność pomiędzy deficytem folianów i żelaza, a zwiększoną ekspresją genów kodujących ich transportery na poziomie mRNA lub/i białek. Do tej pory nie wiadomo jak jednoczesna suplementacja żelaza i FA może wpływać na ekspresję wcześniej wspomnianych genów i czy może wpływać istotnie na parametry związane z metabolizmem żelaza i folianów oraz erytropoezę.

Celem pracy doktorskiej jest poznanie wpływu transporterów żelaza i folianów w dwunastnicy i wątrobie na ich wchłanianie, stan odżywienia tymi składnikami pokarmowymi oraz parametry stanu zapalnego.

W ramach proponowanej rozprawy doktorskiej uwzględnione zostało zrealizowanie następujących zadań badawczych: analiza ekspresji transporterów folianów i żelaza w dwunastnicy i wątrobie na poziomie mRNA i białek, analiza

parametrów charakteryzujących gospodarkę folianów i żelaza w surowicy i osoczu oraz parametrów morfologicznych krwi.

Aby zrealizować cel badań przeprowadzono eksperyment na szczurach laboratoryjnych. W pierwszym etapie doświadczenia (28 dni) u pierwszej grupy szczurów zastosowano dietę deficytową w żelazo i FA (D). Drugą grupą była grupa kontrolna karmiona standardową dietą dla zwierząt laboratoryjnych - AIN93M (C). W drugim etapie doświadczenia szczury z grupy deficytowej podzielono na cztery podgrupy: zwierzęta karmione dietą ze zwiększoną zawartością żelaza (DFE), dietą ze zwiększoną zawartością FA (DFOL), dietą suplementowaną FA i żelazem (FEFOL) oraz grupę deficytową. Po 2, 10 i 21 dniach przeprowadzono sekcje, podczas których pobrano krew, dwunastnicę i wątrobę.

Analizę ekspresji genów *Slc11a2, Slc46a1* w dwunastnicy oraz *TfR2, Rfc* w wątrobie wykonano metodą PCR w czasie rzeczywistym przy pomocy sond TaqMan na aparacie Light Cycler 480 (Roche, Szwajcaria). genów. Genami referencyjnymi były geny *Actb* i *18S*. Relatywny poziom ekspresji genów został obliczony metodą maksimum drugiej pochodnej. Za pomocą techniki Western-blot dokonano analizy relatywnego poziomu ekspresji białek w dwunastnicy oraz wątrobie. Detekcja chemiluminescencji została przeprowadzona za pomocą aparatu ChemiDoc MP Imaging System (BioRad, USA). Stężenie żelaza zostało oznaczone przy pomocy komercyjnego zestawu (Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Utajoną zdolność wiązania żelaza (UIBC) oznaczono przy pomocy zestawu firmy DiaSys (Germany) metodą fotometryczną na analizatorze biochemicznym Konelab 20i (Thermo Electron, Vantaa, Finland). Całkowita zdolność wiązania żelaza (TIBC) została wyznaczona poprzez zsumowanie stężenia żelaza i UIBC. Analizę stężenie kwasu foliowego przeprowadzono na aparacie a Cobas 6000 (Roche Diagnostics, USA), metodą elektrochemiluminescencji. Stężenie homocysteiny we krwi zostało oznaczone metodą enzymatyczną przy pomocy komercyjnego zestawu (Diazyme Homocysteine Assay, Diazyme Laboratories) na aparacie Konelab 20i Analyzer (Thermo Electron, Vantaa, Finland). Badanie morfologiczne krwi zostało zlecone firmie Synevo (Poznań) i przeprowadzone na aparacie SYSMEX XT-400. Stężenie hepcydyny w osoczu zostanie przeanalizowane za pomocą zestawu Rat Hepcidin ELISA Kit (Fine Test, China).

Analiza poziomu ekspresji genów w dwunastnicy wykazała, że grupa D miała wyższy poziom ekspresji genu *Slc11a2* na poziomie mRNA niż grupa DFE w każdym

punkcie czasowym ($p<0,05$). Po 21 dniach od zastosowania suplementacji zaobserwowano istotne różnice w poziomach mRNA genu *Slc46a1* między grupami DFE i FEFOL ($p<0,05$), jednakże nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami w ekspresji na poziomie białka. Szczury z grupy DFE i D miały niższe stężenia folianów w surowicy w każdym punkcie czasowym ($p<0,01$), jednocześnie najwyższe stężenia homocysteiny w osoczu ($p<0,05$). Stężenie TIBC było najniższe w grupie DFE w pierwszym punkcie czasowym oraz w grupach DFE i FEFOL w ostatnim punkcie czasowym ($p<0,001$). Zwierzęta jednocześnie suplementowane kwasem foliowym i żelazem miały znacznie wyższe stężenie hemoglobiny, niż szczury suplementowane tylko kwasem foliowym lub żelazem. Wyniki wskazują, że niedobór kwasu foliowego i żelaza w diecie, a następnie suplementacja tymi składnikami odżywczymi, wpływają na transkrypcję, ale nie na poziom białek transportujących żelaza w dwunastnicy.

Analiza poziomu ekspresji genów w wątrobie wykazała, że po 2 dniach zastosowanej suplementacji relatywny poziom ekspresji genu *Tfr2* był o 78% niższy w grupie DFE niż w grupie C ($p<0,05$), po 10 dniach poziom mRNA genu *TfR2* w grupie FEFOL był o 82% niższy niż w grupie C i DFE ($p<0,01$). Jednak nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupami na poziomie białka w żadnym punkcie czasowym. Stężenia hepcydyny w osoczu były istotnie wyższe w grupach DFE i FEFOL niż w grupie D w trzecim punkcie czasowym ($p <0,01$). Relatywny poziom mRNA i białek genu *Slc19a1* nie różnił się między grupami w żadnym punkcie czasowym. Suplementacja wpłynęła na metabolizm żelaza i poziom metabolitów z nim związanych, ale transporter TFR2 nie uczestniczył w tym procesie. Stężenie hepcydyny w osoczu uległo zwiększeniu po zastosowaniu długoterminowej (21-dniowej) suplementacji żelaza.

Po dziesięciu dniach od zastosowania suplementacji FA szczury w grupie DFOL miały o 21% wyższe stężenie białych krwinek (WBC) niż w grupie FEFOL ($p <0,05$). Nie zaobserwowano żadnych różnic między grupami pod względem stężenia białka C-reaktywnego. Nie stwierdzono również innych różnic między grupami w pozostałych parametrach morfologicznych. Analiza korelacji między parametrami morfologii krwi, a ekspresją transporterów żelaza i folianów dała sprzeczne wyniki.