

SŁAWOMIR LEWICKI¹, DARIUSZ RATTMAN¹, TOMASZ KURYŁ¹,
MAREK SNOCHOWSKI², BOGDAN DĘBSKI¹

WPŁYW CHROMU (III) NA METABOLIZM KWAŚÓW TŁUSZCZOWYCH ORAZ EKSPRESJĘ GENÓW SZLAKU INSULINOWEGO W KOMÓRKACH MIĘŚNIOWYCH MYSZY LINII C2C12

Streszczenie

Jony chromu (III) mają istotny wpływ na przemianę węglowodanowo-lipidową ludzi i zwierząt, powodując u chorych na cukrzycę wzrost wrażliwości komórek na insulinę, zwiększenie przemian kwasów tłuszczowych, spadek masy ciała i poziomu wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy. Celem pracy było zbadanie działania chromu na proces beta-oksydacji kwasów tłuszczowych oraz zmiany ekspresji genów szlaku insulinowego w tkance mięśniowej. Do badań użyto mysich komórek mięśniowych linii C2C12 poddanych 4-dniowemu różnicowaniu. Chrom dodawano do medium w postaci chlorku lub pikolinianu chromu a aktywność β -oksydacji mierzono po 1, 3, 6 lub 48 godzinnej inkubacji. Suplementacja chromem w stężeniu $1 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ spowodowała wzrost ($p < 0,001$) aktywności procesu spalania kwasów tłuszczowych w 1, 3 godzinie inkubacji z pikolinianem oraz w 1, 3, i 6 godzinie inkubacji z chlorkiem chromu. Po 48 godzinnej inkubacji z jonami chromu obserwowano obniżenie aktywności tego procesu. Wpływ chlorku chromu $10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ na ekspresję genów zaangażowanych w szlak przekazywania sygnału od insuliny określono z wykorzystaniem mikromacierzy SuperArray. Chrom po 4 godz. inkubacji spowodował wzrost ekspresji 22 genów natomiast po 24 godzinach wzrost dwóch i spadek ekspresji dwóch genów w porównaniu z kontrolą. Uzyskane wyniki wskazują na pozytywny wpływ suplementacji chromem na zwiększenie aktywności β -oksydacji. Dane uzyskane techniką mikromacierzy wskazują na interakcję jonów chromu ze szlakiem przewodzenia sygnału insulinowego również na poziomie transkrypcyjnym. Wzrost ekspresji genów związanych z metabolizmem lipidów i genów docelowych dla PPAR sugerują trwałe efekty wywołane przez jony chromu.

Słowa kluczowe: chlorek chromu, pikolinian chromu, β -oksydacja, mikromacierze Super miocyty C2C12

¹ Mgr inż.S. Lewicki, T. Kurył, prof. dr hab.B. Dębski, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Nauk Fizjologicznych ul. Nowoursynowska 159, 02-787 Warszawa

² M. Snochowski, Instytut Fizjologii i Żywności Zwierząt im. Jana Kielanowskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Instytucka 3, 05-110 Jabłonna

Wprowadzenie

Spirala spalania kwasów tłuszczowych (β -oksydacja) jest jednym ze sposobów komórki na pozyskanie energii. Rozpoczyna się od transportu acylo-CoA z cytoplazmy komórki do mitochondrium przez kompleks błonowych transferaz karnityno-palmitynowych (CPT1/CPT2). Aktywność tych transporterów inhibowana jest m.in. przez malonylo-CoA, który jest produktem pośrednim syntezy kwasów tłuszczowych [1]. Aktywne spalanie kwasów tłuszczowych może być również regulowane na poziomie transkrypcyjnym np. przez czynniki transkrypcyjne takie jak PPARs (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*) czy SREBPs (ang. *sterol-regulated transcription factors*) [10]. Odmienną grupę czynników stanowią pierwiastki śladowe, w tym jony chromu (III).

Chrom jest pierwiastkiem śladowym niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów zwierząt i ludzi. W organizmach żywych formą biologicznie czynną chromu są jony na +3 stopniu utlenienia. Jego niedobór w organizmie prowadzi do zaburzeń w metabolizmie węglowodanów i lipidów. Objawy tego procesu są takie jak w przypadku cukrzycy oraz schorzeń sercowo-naczyniowych: obniżona tolerancja glukozy, hiperglikemia, hiperinsulinemia, zwiększenie poziomu cholesterolu i triglicerydów, zmniejszenie poziomu lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL) [32]. Główną funkcją tego pierwiastka, jako dodatku do żywności, jest zwiększenie wrażliwości komórek na insulinę a co za tym idzie polepszenie stanu diabetyków. Mechanizm działania chromu tłumaczy się wpływem na procesy sterowane przez receptor insulinowy [32,7].

Oprócz wpływu na metabolizm glukozy trójwartościowy chrom bierze udział w metabolizmie lipidów. W wielu badaniach wykazano, że suplementacja diety chromem powoduje obniżenie we krwi poziomu całkowitego cholesterolu, frakcji LDL-cholesterolu, triglicerydów i nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych oraz podwyższenie stężenia frakcji HDL-cholesterolu powiązane z obniżeniem masy ciała u zwierząt i ludzi z cukrzycą [16,26,14]. Dostępne są jedynie nieliczne wyniki badań, dotyczące wpływu suplementacji Cr na metabolizm węglowodanowo-lipidowy w osoczu u zdrowych osobników. Skarmianie jałówek dietą z dodatkiem chromu (propionian chromu, 5, 10, lub 15 mg Cr^{3+} /dzień) spowodowało zależne od dawki obniżenie poziomu wolnych kwasów tłuszczowych [30], natomiast u krów dodatek chromo-L-metioniny (0,03 lub 0,06 mg Cr^{3+} /kg masy ciała) nie wpłynął na poziom wolnych kw. tłuszcz. w osoczu krów w okresie przed- i poporodowym [29]. W przypadku świń, podawanie pikolinian chromu do pożywienia (200 ppb) prowadziło do obniżenia poziomu nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych w osoczu [21,18] natomiast suplementacja diety chromem (pikolinian chromu, 200 ppb) u ciężarnych loch spowodowała wyższy niż w grupie kontrolnej poziom nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych w osoczu, zarówno przed jak i po posiłku. Wykazano również, że suplementacja poży-

wienia pikolinianem chromu (0,5 i 5 mg Cr/kg) nasila β -oksydację kwasów tłuszczowych w limfocytach u zdrowych szczurów płci męskiej [15]. Ze względu na zróżnicowanie wyników i różne modele doświadczalne trudno o wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Dlatego postanowiono zbadać wpływ różnych soli i stężeń chromu, na aktywność spalania kwasów tłuszczowych w układach izolowanych.

W przypadku badań *in vivo* na uzyskane efekty wpływ mogą mieć czynniki takie jak zmienność międzygatunkowa, stan fizjologiczny zwierzęcia, zastosowana dawka i forma chromu, sposób podania suplementu, jego biodostępności. Dlatego też, w badaniu będącym przedmiotem niniejszej publikacji, do wyjaśnienia wpływu chromu na proces beta-oksydacji kwasów tłuszczowych wykorzystano hodowlę komórkową *in vitro*, które pozwalają na łatwe porównanie działania różnych form chromu, ich stężeń oraz zbadanie kinetyki procesu. Dodatkowo postanowiono określić wpływu chromu na transkrypcję genów powiązanych ze szlakiem przewodnictwa insuliny.

Material i metody badań

Hodowla komórkowa. Do badań użyto linii komórkowej mysich miocytów C2C12 zakupionych w banku komórek European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC Porton Down, Anglia). Podstawowe medium hodowlane zawierało DMEM with Glutamax[®] (Gibco, Szkocja) z dodatkiem antybiotyków: penicyliny i streptomycyny (50 IU/ml), fungizonu (amfoterycyna 1,25 μ g/ml), gentamycyny (30 μ g/ml) (Gibco, Szkocja) i 8 μ g/ml tylozyny (Sigma Aldrich Chemical Co.; ST.Louis, MO). Medium wzrostowe (używane do proliferacji komórek C2C12) zawierało poza tym 10% bydlęcą surowicę płodową (FBS, o/o) natomiast medium używane do różnicowania - 2% surowicę końską (HS, o/o) (obie surowice z Gibco, Szkocja). Podczas hodowli pożywkę wymieniano co 48 godzin, dwukrotnie przepłukując komórki roztworem fizjologicznym buforowanym fosforanami (PBS, Gibco, Szkocja). Komórki hodowano w inkubatorze z dopływem CO₂ (5% CO₂, 95% powietrza wysycanego parą wodną, 37°C, SANYO Electric Co., Ltd. Japonia), a wszystkie czynności prowadzone na kulturach komórkowych wykonywano w komorze laminarnej z pionowym nawiewem sterylnego powietrza [11] używając sterylnego sprzętu i odczynników i zachowując zasady aseptyki.

Związki chromu zakupione w Sigma Aldrich (Sigma Aldrich Chemical Co.; ST.Louis, MO, USA) rozpuszczano w wodzie dejonizowanej i sterylizowano za pomocą filtrów strzykawkowych.

Utlenianie kwasów tłuszczowych (β – oksydacja). Komórki wysiewano na płytki 24-dółkowe w stężeniu 25 tys. kom./cm² w pożywce wzrostowej (DMEM + 10% FBS). Po uzyskaniu 80 - 90 % komórki poddano różnicowaniu (DMEM + 2% HS) przez okres 4 dni. Na 12 godzin przed wykonaniem doświadczenia usuwano medium różnicujące i podawano medium podstawowe (DMEM). Czynniki doświadczalne podawano

w medium podstawowym na okres 1, 3, 6 lub 48 godz. Po inkubacji z badanymi czynnikami pożywkę usuwano, przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS i wprowadzano po 300 μ l mieszaniny reakcyjnej/dotek zawierającej kwas palmitynowy w stężeniu 277,5 Bq. Po 60 min inkubacji w 37°C do dołków dodawano 200 μ l 2M NaOH. Po 24 godz. z lizatów komórkowych pobierano po 50 μ l na oznaczenie białka [19] a resztę przenoszono na kolumnę z AG-1-X8 (Bio – Rad, Germany). Przesącz poddawano analizie izotopowej w liczniku scyntylnym (Pacard TRI-CARB, Pacard, Minnesota, USA). Aktywność β - oksydacji w komórkach C2C12 określano na podstawie ilości trytowanej wody powstałej w wyniku rozkładu trytowanego kwasu palmitynowego ([9,10-³H]-kwas palmitynowy; Amersham, UK) metodą Manninga i wsp. [20,13]. Wyniki podawano w pmolach rozłożonego kwasu palmitynowego na 1 min. na 1 g białka. Wyniki stanowią średnia z 4 odrębnych doświadczeń. Przedstawiono je jako % wartości uzyskanej dla kontroli.

Identyfikacja genów szlaku insulinowego – mikromacierze SuperArray. Do identyfikacji aktywności genów zaangażowanych w procesy sterowane insuliną wykorzystano technikę SuperArray[®], która oferuje gotowe zestawy (kity) do tego typu analiz. Płytkę hybrydacyjną zawiera 120 interesujących nas genów w tym geny referencyjne (używane do walidacji metody). Komórki linii C2C12 wysiano na szalki Petriego (o pow. 75 cm²) w stężeniu 25 tys. kom./cm². Po uzyskaniu 80 - 90 % komórki poddano różnicowaniu (DMEM+2% HS) przez okres 4 dni. Na 12 godz. przed wykonaniem doświadczenia usuwano medium różnicujące i podawano DMEM. Doświadczenie macierzowe zaplanowano dwutorowo w celu zbadania krótkotrwałego (4 godz.) i długotrwałego (24 godz.) oddziaływania jonów chromu na ekspresję genów. Po inkubacji pożywkę usuwano a komórki przepłukiwano dwukrotnie roztworem zimnego PBS (4°C). Płytkę umieszczano w lodzie, a komórki zeskrobywano do sterylnych probówek typu eppendorf i wirowano (700 g 5 min, MniSpin, Eppendorf, Niemcy). Osad komórek zamrażano w -80°C do czasu analizy. Izolację całkowitego RNA przeprowadzono przy użyciu Array Garder[™] Total RNA Isolation Kit według procedury zamieszczonej przez producenta. Następnie ilość i jakość wyizolowanego RNA badano przy użyciu NanoDrop ND -1000 (Thermo Fisher Scientific USA) oraz 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). Do analizy wybrane zostały próbki, których RIN (wartość indeksu integralności - stosunek 28s/18s RNA) wynosił 8,5 i więcej. Do syntezy nici cDNA użyto 5 μ g wyizolowanego RNA. Aby uzyskać takie stężenie w 9 μ l (objętość zalecana przez producenta do dalszych analiz) zawartość próbek podlegała częściowemu odparowaniu w koncentratorze (Concentrator 5301, Eppendorf, Niemcy), lub uzupełnieniu wodą (H₂O RNA-free). Syntezę nici cDNA i cRNA przeprowadzono według procedury zawartej w TrueLabeling-AMP[™] 2.0 z użyciem odczynników dołączonych przez producenta. Następnie cRNA oczyszczono przy użyciu cRNA Cleanup Kit i mierzono jego stężenie na NanoDrop ND-1000. Hybrydycję przeprowadzono w piecu hybry-

dyszacyjnym (G2545a, Agilent Technologies, USA) w temperaturze 60°C przez 24 godz. według procedury Oligo GEArray® System przy użyciu dostarczonych przez producenta odczynników. Wynik hybrydyzacji obrazowano na kliszach rentgenowskich, które następnie skanowano (Canon LiDE 60, Tokio, Japonia). Skany klisz umieszczano na stronie producenta zestawu. Analizę wyników przeprowadzono w programie GEArray Expression Analysis Suite znajdującym się na stronie: www.geasuite.superarray.com. Wyniki zostały standaryzowane wobec genów referencyjnych znajdujących się na każdej płycie (Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), Rps27a (Ribosomal protein S27a), B2m (Beta-2 microglobulin) i podwójnych kopii genów: Hsp90ab1 (Heat shock protein 90 kDa alpha - cytosolic, class B member 1), Ppia (Peptidylprolyl isomerase A). Do analizy wybrano geny, których ekspresja różniła się co najmniej dwukrotnie w porównaniu z wartością uzyskaną dla kontroli (DMEM). Było to doświadczenie pilotowe, wykonane w 1 powtórzeniu.

Analizę poziomu istotności wykonano za pomocą standardowego testu one-way ANOVA przy zastosowaniu programu komputerowego GraphPad Prism 4.0 (Microsoft, Seattle, USA).

Wyniki i dyskusja

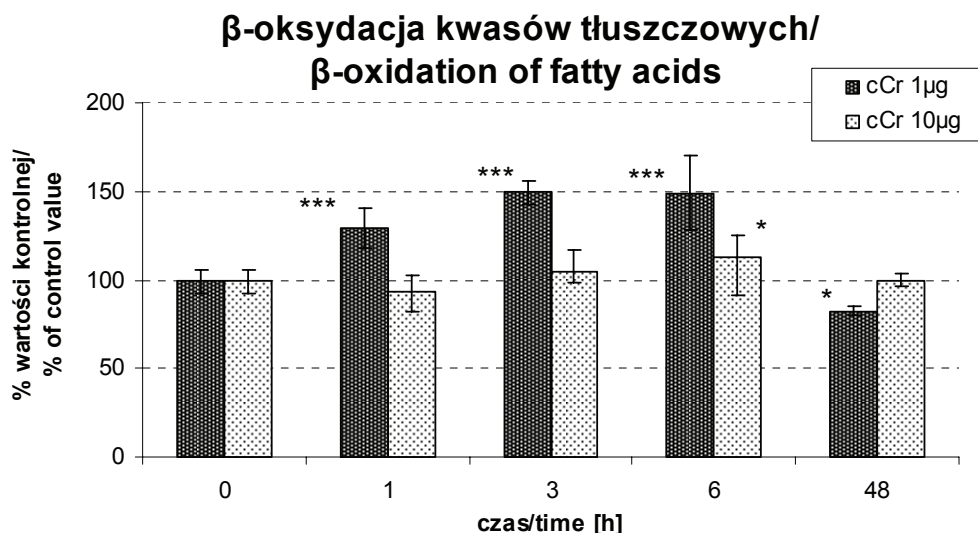
β – oksydacja. Wpływ jonów chromu, podawanego w postaci chlorku i pikolinianu, badano w stężeniu 1 i 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ po 1, 3, 6 i 48 godz. stymulacji z czynnikiem. Kontrolę stanowiła hodowla z DMEM bez dodatku chromu. Wyniki przedstawiono w procentowych wartościach próby kontrolnej, dla której szybkość przemiany kwasu palmitynowego wynosiła $19,72 \pm \text{SD}$ pmol/min/g białka.

Jony chromu (chlorku i pikolinianu) zastosowane w małych dawkach (1 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$) stymulowały proces β -oksydacji w krótkim okresie 1 - 6 godz., natomiast po 48 godz. stymulacji powodował nieznaczne obniżenie wartości tego procesu w porównaniu z wartością kontrolną. Po zastosowaniu stężenia 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ nie zauważono istotnych statystycznie różnic w procesie β -oksydacji.

Zauważono odmienny wpływ soli chromu na proces beta-oksydacji w czasie 1 - 6 godz. Chlorek chromu stymulował ten proces w czasie osiągając najwyższą wartość w 6 godz. inkubacji, natomiast dla pikolinianu chromu najwyższe efekty obserwowano po 1 godz. inkubacji, po czym efekt stopniowo zanikał. Wpływ chlorku i pikolinianu chromu po 48 godz. inkubacji był podobny. W obu badanych solach wyższe efekty stymulacyjne w okresie 1 - 6 godz. inkubacji wykazywały stężenia 1 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$, natomiast po 48 godzinach 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$.

Chlorek chromu, w obu badanych stężeniach, wykazał zależne od czasu nasilenie procesów spalania tłuszczów w czasie 1 – 6 godz. inkubacji. Zmiany miały charakter liniowy, który można opisać wzorami $y = 0,0722x + 1,0677$, $R^2 = 0,6868$ dla cCr1, oraz $y = 0,0364x + 0,9164$, $R^2 = 0,9461$ dla cCr10. Najwyższy efekt stymulacyjny dla

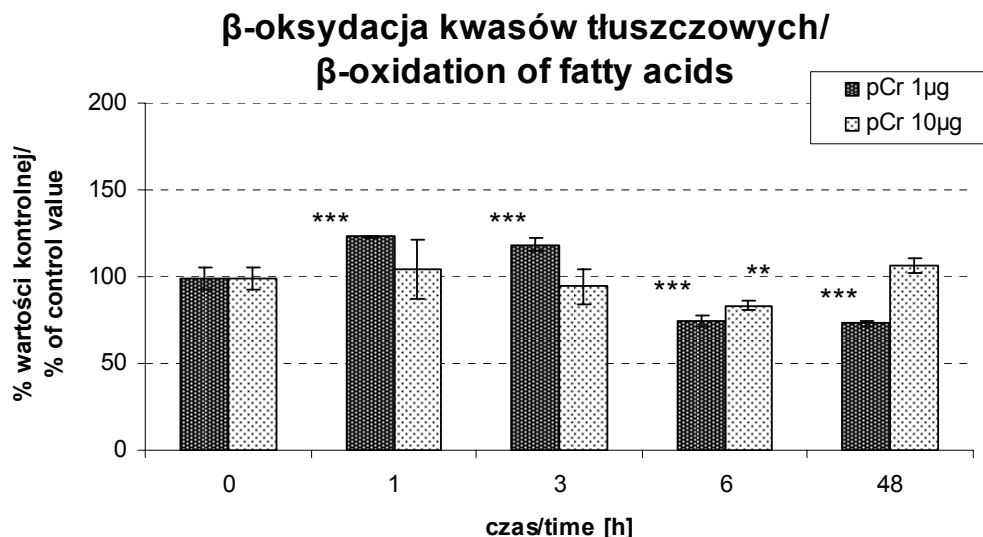
stężenia $1 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ wynosił około 50% (3 i 6 godz. inkubacji, $p < 0,01$), natomiast dla stężenia $10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ około 12% (6 godz., $p < 0,05$). Po 48h inkubacji stwierdzono zmniejszenie procesów spalania kwasów tłuszczowych w przypadku inkubacji z $1 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ (około 20%, $p < 0,05$), natomiast dla stężenia $10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ nie zauważono istotnych zmian (rys. 1.).



Rys. 1. Wpływ chlorku chromu (III) podawanego w stężeniu 1 i $10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ na procesy β -oksydacji kwasów tłuszczowych w komórkach linii C2C12 poddanej różnicowaniu. Badanie przeprowadzono po 1, 3, 6, lub 48 godzinie inkubacji z jonami chromu. Wyniki stanowią średnią z 4 odrębnych doświadczeń. Wyniki przedstawiono jako % wartości kontrolnej ($\pm\text{SD}$; $n = 10$). * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$

Fig. 1. The effect chromium ions (III) concentrations (1 and $10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$) on fatty acids β -oxidation in differentiated C2C12 cells incubated for 1, 3, 6 or 48 h with chromium chloride. Results originated from 4 distinct experiments. Results are presented as % of control value ($\pm\text{SD}$; $n = 10$). * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$

Najwyższy efekt stymulacji procesu β -oksydacji pod wpływem pikolinianu chromu obserwowano po 1 godz. inkubacji (około 20%, $p < 0,001$, dla pCr1). Wydłużanie czasu inkubacji z czynnikiem powodowało obniżenie aktywności tego procesu, osiągając najniższe wartości w 6 godz. inkubacji (około 75% wartości kontrolnej dla pCr1, $p < 0,001$ i 80% dla pCr10, $p < 0,01$). Zależność pomiędzy czasem inkubacji, a wydajnością procesu β -oksydacji można opisać wzorami, które dla stężenia $1 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ wynosi $y = -0,1014x + 1,3912$, $R^2 = 0,9056$, a dla $10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ - $y = -0,0416x + 1,0796$, $R^2 = 0,995$. Po 48 godzinnej inkubacji stwierdzono zmniejszenie procesów spalania kwasów tłuszczowych w przypadku inkubacji z $1 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ (około 25%, $p < 0,001$), natomiast dla stężenia $10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ nie zauważono istotnych zmian.



Rys. 2. Wpływ pikolinianu chromu (III) podawanego w stężeniu 1 i 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ na procesy β -oksydacji kwasów tłuszczowych w komórkach linii C2C12 poddanej różnicowaniu. Badanie przeprowadzono po 1, 3, 6, lub 48 godzinie inkubacji z jonami chromu. Wyniki stanowią średnią z 4 odrębnych doświadczeń. Wyniki przedstawiono jako % wartości kontrolnej (\pm SD; n = 10). ** - p < 0,01; *** - p < 0,001

Fig. 2. The effect chromium picolinate (III) concentrations (1 and 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$) on fatty acids β -oxidation in differentiated C2C12 cells following 1, 3, 6 or 48 h supplementation with chromium chloride. Results originated from 4 distinct experiments. Results are presented as % of control value, (\pm SD; n = 10). ** - p < 0,01; *** - p < 0,001

Mikromacierze SupeArray. Wpływ jonów chromu III na ekspresję genów badano w stężeniu 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$. Zauważono suplementacja chlorkiem chromu (10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$) spowodowała zmianę ekspresji genów zarówno w 4 jak i w 24 godzinie ekspozycji z czynnikami w porównaniu do warunków kontrolnych (DMEM).

Chlorek chromu (10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$) po 4 godzinnej stymulacji spowodował wzrost ekspresji 21 genów, w tym ekspresja 12 genów nie była odnotowana w kontroli (DMEM). Były to geny, których aktywność klasyfikowana jest jako przynależna do:

- | | |
|---|------|
| 1) bezpośrednich genów szlaku insulinowego | ↑ 1 |
| 2) białek związanych z receptorem insulinowym | ↑ 4 |
| 3) cyklu komórkowego/ różnicowania | ↑ 6 |
| 4) czynników transkrypcyjnych i regulatorów | ↑ 4 |
| 5) genów docelowych dla PPAR | ↑ 3 |
| 6) genów docelowych SREBP1 | ↑ 1 |
| 7) metabolizmu białek | ↑ 13 |
| 8) metabolizmu lipidów | ↑ 6 |
| 9) metabolizmu węglowodanów | ↑ 3 |

- | | |
|---|-----|
| 10) szlaku kinazy PI-3 | ↑ 5 |
| 11) szlaku kinazy MAP | ↑ 3 |
| 12) wtórnych genów efektorowych szlaku insulinowego | ↑ 1 |

↑ - zaznaczono geny, których ekspresja ponad dwukrotnie wzrosła w stosunku do kontroli inkubowanej bez dodatku chromu.

Wśród genów zaangażowanych w metabolizm lipidów dostępnych na płycie mikromacierzowej, jony chromu stymulowały ekspresje: Araf 1, Cebpb, Pklr, Pparg, Prkcc, Prkci, Raf1, Slc27a4, Sorbs1 z czego: Araf 1 Prkcc, Prkci, Raf1, Slc27a4 i Sorbs1 można zaliczyć do genów bezpośrednio zaangażowanych w metabolizm lipidów, Cebpb, Pparg, Slc27a4 do genów regulowanych przez PPAR a Pklr do genów regulowanych przez SREBP1.

Indeks genów, genów zależnych od insuliny, odpowiedzialnych za regulację metabolizmu tłuszczów po 4 godzinnej inkubacji z chlorkiem chromu ($10 \mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$) przedstawiono w tabeli.1.

Po 24 godzinnej inkubacji z chlorkiem chromu zauważono spadek ekspresji dwóch genów i wzrost ekspresji dwóch genów. Były to geny, których aktywność klasyfikowana jest jako przynależna do:

- | | |
|------------------------------------|---------|
| 1) cyklu komórkowego/ różnicowania | ↑ 1 |
| 2) metabolizmu białek | ↑ 2 ↓ 1 |
| 3) metabolizmu węglowodanów | ↓ 2 |
| 4) szlaku kinazy PI-3 | ↑ 1 |

↑ - zaznaczono geny, których ekspresja ponad dwukrotnie wzrosła, natomiast ↓ - tych, których ekspresja ponad dwukrotnie zmalała w stosunku do kontroli inkubowanej bez dodatku chromu.

Po 24 godzinach inkubacji z chromem nie zauważono zmiany ekspresji genów wpływających na metabolizm lipidów.

Sprawnie działający mechanizm regulujący katabolizm kwasów tłuszczowych jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmów. Zaburzenia w tej regulacji lub nadmiar energii dostarczanej z pokarmem powoduje powstanie otyłości. Z medycznego punktu widzenia dietetyczne czynniki mogące wpływać na zmniejszenie masy ciała są bardzo istotne. Wśród nich ważną rolę pełnią jony chromu [28,25].

Badania przeprowadzono na dwóch najczęściej stosowanych, jako suplement diety, solach chromu: nieorganicznej - chlorku chromu i organicznej formy tego związku – pikolinianu chromu. Różnica w budowie chemicznej tych soli powoduje powstanie różnic w adsorpcji z przewodu pokarmowego. W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano zwiększone wchłanianie chromu zastosowanego w postaci pikolinianu (1,1%), w porównaniu do chlorku chromu (0,9%) [2]. U ludzi natomiast wykazano, że przyswajanie chromu w postaci chlorku chromu 0,1 - 0,4% jest dużo niższe niż pikolinianu chromu (2,8%) [9,27]. Obserwowane różnice tłumaczy się lepszym

przenikaniem pikolinianu chromu przez błony komórkowe. Zastosowane przez nas w badaniach stężenia chromu, nie wykazują toksycznego działania na komórki linii C2C12 manifestującego się zmianami w cyklu komórkowym czy tempie proliferacji [17].

Tabela 1

Wpływ chlorku chromu (10 $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{L}$) na ekspresję genów zależnych od insuliny, odpowiedzialnych za regulację metabolizmu tłuszczów w komórkach linii C2C12 poddanych różnicowaniu po 4 godzinach inkubacji. \uparrow - zaznaczono geny, których ekspresja ponad dwukrotnie wzrosła w stosunku do kontroli inkubowanej bez dodatku chromu.

The effect of chromium chloride supplementation (10 $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{L}$) on insulin path genes expression in differentiated C2C12 cells after 4h supplementation. \uparrow - mark genes after more than twice elevation as compared with control cells incubated without chromium.

Symbol genu/ Gene symbol	Nazwa genu/Gene name	Wartość ekspresji genu Gene expression value
<i>Araf</i>	V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog	\uparrow 33,57
<i>Cebpa</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	\uparrow 3,02
<i>Pklr</i>	Pyruvate kinase liver and red blood cell	\uparrow 2,86
<i>Pparg</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	\uparrow 2,26
<i>Prkcc</i>	Protein kinase C, gamma	\uparrow 2,17
<i>Prkci</i>	Protein kinase C, iota	\uparrow 5,25
<i>Raf1</i>	V-raf-leukemia viral oncogene 1	\uparrow 3,35
<i>Slc27a4</i>	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	\uparrow 3,35
<i>Sorbs1</i>	Sorbin and SH3 domain containing 1	\uparrow 2,06

cCr - chlorek chromu

DMEM - pożywka zawierająca: sole nieorganiczne utrzymujące stałe pH i ciśnienie osmotyczne, zestaw aminokwasów, glukozę i witaminy z dodatkiem Glutmaxu (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium with Glutamax*)

pCr - pikolinian chromu

PPAR - receptory aktywujące proliferację peroksyosomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptors*)

SREBP – czynniki transkrypcyjne regulowane przez sterole (ang. *sterol-regulated transcription factors*)

W uzyskanych przez nas wynikach, jony chromu (III) podawane w stężeniu 1 $\mu\text{g Cr}^{3+}/\text{L}$ powodowały zwiększenie aktywności β -oksydacji w pierwszych godzinach inkubacji z tymi jonami. Jest to zgodne z badaniami przeprowadzonymi przez Kuryła i wsp, gdzie wykazano, że suplementacja jonami chromu (96,51 μM) zwiększa aktywność tego procesu w limfocytach izolowanych z krwi szczurów. Zastanawiająca jest tylko różna dynamika zmian w zależności od zastosowanych związków chromu. Chlorek chromu powodował liniowy wzrost intensywności utleniania kwasów tłuszczowych w czasie 1 - 6 godzin, natomiast dla pikolinianu chromu efekt stymulacji osiągał najwyższą wartość w 1 godzinie inkubacji, a w miarę upływu czasu obniżał się. Zaobserwowane zmiany należy tłumaczyć różnicami w budowie strukturalnej podawanych

związków chromu. Chrom w postaci chlorku jest łatwo rozpuszczalny w wodzie, przez co może mieć utrudnione wchłanianie do komórki w porównaniu do pikolinianu chromu, który wykazuje mocno hydrofobowe właściwości. Przyjmując to założenie efekt działania pikolinianu chromu mógł być nasilony przez pierwszą godzinę inkubacji a następnie zanikał ze względu na zwiększającą się ilość produktów β - oksydacji. Zmniejszona kinetyka wchłania chromu podanego w postaci chlorku chromu mogłaby tłumaczyć wzrost aktywności procesów beta-oksydacji w czasie. Z drugiej strony nie należy zapomnieć o dużej dysproporcji wielkości między tymi solami. Chrom podany w postaci chlorku będzie transportowany do komórek w postaci jonów przez kanały jonowe, natomiast pikolinian chromu, jako cała cząsteczka. Dysocjacja chromu z pikolinianu chromu wiązałaby się z wydzieleniem do komórki 3 cząsteczek kwasu pikolinowego, co może ujemnie wpływać na metabolizm komórki w tym na β -oksydację.

Jony chromu, które znalazły się wewnątrz komórki mogą przechodzić do jądra komórkowego, gdzie bezpośrednio lub pośrednio (np. przez aktywację receptorów estrogenowych) mogą oddziaływać na ekspresję genów [5,22,6]. W badaniach przeprowadzonych na komórkach wątrobowych Hepa-1 (mysia hepatoma) z użyciem izotopu ^{53}Cr (chrom podawano w postaci $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 25 μM) wykazano, że około 30 % jest akumulowane w jądrach komórkowych. Dostępne w literaturze wyniki badań wpływu chromu na ekspresję genów dotyczą głównie oznaczeń genów, które zmieniły swoją ekspresję po zastosowaniu toksycznych form chromu VI [11,23,12]. Przedmiotem przeprowadzanych przez nas analiz był natomiast aspekt regulacji przez chrom ekspresji genów związany z efektami wywołanymi przez insulinę. Zaobserwowano wzrost ekspresji 22 genów ze 120 dostępnych na mikromacierzy po 4 godzinnej inkubacji z jonami chromu, z czego 1 można zaliczyć, jako gen docelowy indukowane przez SREBP, 3 jako geny docelowe indukowane przez PPAR, a 6 z nich jako geny zaangażowane w metabolizm lipidów. Sterowanie transkrypcją genów przez jony chromu może być sposobem na wyjaśnienie ingerencji tego pierwiastka zarówno w metabolizm cukrów jak i tłuszczów.

Wnioski

1. Jony chromu (III) podawane w stężeniu 1 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ powodują zwiększenie aktywności β -oksydacji w 1, 3 (dla pikolinianu) i 1, 3, i 6 (dla chlorku) godzinie inkubacji. Po 48 godzinnej inkubacji suplementacja jonami chromu spowodowała obniżenie aktywności tego procesu.
2. Chrom podawany w postaci chlorku wykazuje silniejsze działanie stymulacyjne niż w postaci pikolinianu
3. Nie zauważono istotnego wpływu obu soli chromu stosowanych w stężeniu 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$, co może sugerować, że dawka 1 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ jest dawką graniczną, zdolną do wywołania efektu biologicznego

4. Wyniki analizy mikromacierzy wskazują na aktywne działanie jonów chromu (III), jako aktywatora ekspresji genów szlaku insulinowego (wzrost ekspresji 22 genów po 4 godzinnej inkubacji), co może być jednym z mechanizmów działania chromu na metabolizm węglowodanowo-lipidowy w komórkach mięśniowych.

Literatura

- [1] Abu-Elheiga L., Oh W., Kordari P., Wakil S.J.: Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 10207–10212.
- [2] Anderson R.A., Bryden N.A., Polansky M.M., Gautschi K.: Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats., *J. Trace Elem. Exp. Med.*, 1996, 9, 11-25.
- [3] Cheng R.Y., Alvord W.G., Powell D., Kasprzak K.S., Anderson L.M.: Microarray analysis of altered gene expression in the TM4 Sertoli-like cell line exposed to chromium(III) chloride., *Reprod Toxicol*, 2002; 16(3), 223-36.
- [4] Choe S.Y., Kim S.J., Kim H.G., Lee J.H., Choi Y., Lee H., Kim Y.: Evaluation of estrogenicity of major heavy metals., *Sci Total Environ*, 2003, 312, 1-3, 15-21.
- [5] Dong F., Kandadi M.R., Ren J., Sreejayan N.: Chromium (D-phenylalanine)₃ supplementation alters glucose disposal, insulin signaling, and glucose transporter-4 membrane translocation in insulin-resistant mice., *J Nut.*, 2008, 138, 10, 1846-1851.
- [6] European Commission (EC). Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Trivalent Chromium. 2003 http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out197_en.pdf.
- [7] Evans R.M., Barish G.D., Wang Y.X.: PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*, 2004, 10, 355–361.
- [8] Holland S., Lodwig E., Sideri T., Reader T., Clarke I., Gkargkas K., Hoyle D.C., Delneri D., Oliver S.G., Avery S.V.: Application of the comprehensive set of heterozygous yeast deletion mutants to elucidate the molecular basis of cellular chromium toxicity., *Genome Biol*, 2007, 8, 12, R268.
- [9] Joseph P., He Q., Umbright C.: Heme-oxygenase 1 gene expression is a marker for hexavalent chromium-induced stress and toxicity in human dermal fibroblasts., *Toxicol Sci*, 2008, 103, 325-334.
- [10] Kurył T., Adamowicz M., Dębski B., Bertrand J., Martinik K.: Degradation of [9,10] - 3H - myristic acid by lymphocytes. Screening test of inherited disorders of activation, transport and mitochondrial oxidation of fatty acids. *Ateroskleroza*. 2001, 5, 23-27.
- [11] Kurył T., Debski B., Martinik K.: The effect of microelements supplementation on beta-oxidation activity in healthy and type 1 diabetic rats., *Cent Eur J Public Health*, 2008, 16, 4, 205-208.
- [12] Kurył T., Krejpcio Z., Wojciak R.W., Lipko M., Staniek H.: Chromium(III) propionate and dietary fructans supplementation stimulate erythrocyte glucose uptake and beta-oxidation in lymphocytes of rats., *Biol Trace Elem Res*, 2006, 114(1-3), 237-48.
- [13] Lai M.H., Chen Y.Y., Cheng H.H.: Chromium yeast supplementation improves fasting plasma glucose and LDL-cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats., *Int J. Vitam. Nutr. Res.*, 2006, 76 (6), 391-397.
- [14] Lewicki S., Rattman D., Gajewska M., Snochowski M., Dębski B.: Wpływ stężenia chromu (III) oraz genisteiny na proliferację komórek mięśniowych myszy linii C2C12., *Żywnienie człowieka i metabolizm*, 2007, 34, 96-104.
- [15] Lindemann M.D., Cromwell G.L., Monegue H.J., Purser K.W.: Effect of chromium source on tissue concentration of chromium in pigs., *J Anim Sci*, 2008, 86, 11, 2971-2978.
- [16] Lowry O.H., Rosenborough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin reagent., *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265-275.
- [17] Manning N.J., Olpin S.E., Pollitt R.J., Webley J.: A comparison of [9,10-³H] myristic acid for the detection of defects of fatty acid oxidation in intact fibroblast., *J Inher. Metab. Dis*. 13, 1990, 58-68.

- [18] Matthews J.O., Southern L.L., Fernandez J.M., Pontif J.E., Bidner T.D., Odgaard R.L.: Effect of chromium picolinate and chromium propionate on glucose and insulin kinetics of growing barrows and on growth and carcass traits of growing-finishing barrows., *J Anim Sci*, 2001, 79(8), 2172-8.
- [19] Mumtaz M.M., Tully D.B., El-Masri H.A., De Rosa C.T.: Gene induction studies and toxicity of chemical mixtures., *Environ Health Perspect*, 2002, 110, Suppl 6, 947-956.
- [20] Pereira Y., Lagniel G., Godat E., Baudouin-Cornu P., Junot C., Labarre J.: Chromate causes sulfur starvation in yeast., *Toxicol. Sci.*, 2008, 106, 400-412.
- [21] Rand J.S., Farrow H.A., Fleeman L.M., Appleton D.J.: Diet in the prevention of diabetes and obesity in companion animals., *Asia Pac J Clin. Nutr*, 2003, 12, Suppl: S6.
- [22] Sahin K., Onderci M., Tuzcu M., Ustundag B., Cikim G., Ozercan I.H., Sriramoju V., Juturu V., Komorowski J.R.: Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat., *Metabolism*, 2007, 56, 9, 1233-1240.
- [23] Sandstead H.H., Nielsen F.H.: The origin and evolution of the Grand Forks Human Nutrition Research Center, 1970–90., *J Nutr*, 2009, 139, 173-177.
- [24] Saper R.B., Eisenberg D.M., Phillips R.S.: Common dietary supplements for weight loss., *Am Fam Physician*, 2004, 70, 9, 1731-1738.
- [25] Smith K.L., Waldron M.R., Ruzzi L.C., Drackley J.K., Socha M.T., Overton T.R.: Metabolism of dairy cows as affected by prepartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the periparturient period., *J Dairy Sci*, 2008, 91, 2011-2020.
- [26] Sumner J.M., Valdez F., McNamara J.P.: Effects of chromium propionate on response to an intravenous glucose tolerance test in growing Holstein heifers., *J Dairy Sci*, 2007, 90, 3467-3474.
- [27] Vincent J.B.: The biochemistry of chromium. *J. Nutr.*, 2000, 130, 715-718. – 33. Wei Y.D., Teperman K., Huang M., Sartor M.A., Puga A., Chromium inhibits transcription from polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible promoters by blocking the release of histone deacetylase and preventing the binding of p300 to chromatin. *J Biol Chem*, 2004, 279, 4110-4119.

THE EFFECT OF CHROMIUM (III) ON FATTY ACID METABOLISM AND INSULIN PATH RELATED GENE EXPRESSION IN MOUSE MYOCYTES CELL LINE C2C12

Summary

Chromium (III) ions influence significantly carbohydrate-lipid metabolism causing in diabetic subjects an optimisation of insulin action, increase of lipid alteration, decrease body weight and free fatty acids plasma level. The aim of the present study was to describe changes in β -oxidation of fatty acids and gene expression following chromium supplementation. The experiments were performed in mouse myoblast C2C12 cell line over 4 days differentiation. Chromium was added to medium (DMEM), as chromium chloride (CrCl_3) or chromium picolinate, in 1 and 10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ concentrations. Beta-oxidation of fatty acids activity was measured after 1, 3, 6, or 48 h. incubations. Introduction of chromium 1 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$ to cell culture resulted intensification of fatty acids oxidation after 1 and 3 h (picolinate, $p < 0,001$) and 1, 3, and 6 h (chloride, $p < 0,001$) incubation. We observed higher stimulation effect along chromium chloride administration (about 50% of control value) than chromium picolinate (25% of control value). After 48h incubation decrease of fatty acids oxidation were noticed. The influence of chromium chloride (10 $\mu\text{gCr}^{3+}/\text{L}$) supplementation on gene expression was examined using microarray SuperArray technique. Chromium added caused increase in 22 genes expression over 4h while only 2 increase and 2 decrease over 24h incubation in compare with control. The results in these studies showed positive effect of chromium supplementation on activity of β -oxidation. Results from microarray analysis indicate chromium interaction on signaling insulin pathway, also on transcription level. Increased expression of genes engaged in lipid metabolism and genes activated by peroxisome proliferator-activated receptor PPAR suggest permanent effect caused by chromium ions.

Key words: chromium chloride, chromium picolinate, β -oxidation of fatty acids, microarray, C2C12 myocytes. 