

1. Cele projektu badawczego / Hipoteza badawcza

Gromadzenie się tłuszczu w wątrobie (stłuszczenie wątroby) dotyczy coraz większej liczby osób na całym świecie. Liczne badania wykazały, że izoflawony pochodzące np. z soi chronią przed tym zaburzeniem, jednak mechanizmy tego działania nie zostały w pełni opisane. Stłuszczenie wątroby może być spowodowane różnymi czynnikami. Wśród nich można wymienić np. zaburzenia metabolizmu grup jednowęglowych, na który to składają się wzajemnie powiązane ze sobą szlaki przemian metioniny, folianów i choliny. Niedobór choliny, a konkretnie fosfatydylocholiny, upośledza eksport lipidów z wątroby. Cholina jest składnikiem odżywczym, który może być dostarczany wraz z pożywieniem (głównie pochodzenia zwierzęcego), ale może być także syntetyzowana w wątrobie przez enzym zwany metylotransferazą fosfatydyloetanolaminy (PEMT). Tempo syntezy fosfatydylocholiny zależy od poziomu ekspresji genu *PEMT*, który natomiast zależy od stężenia estrogenów. Izoflawony sojowe, do których należą przede wszystkim genisteina i daidzeina, wykazują strukturalne podobieństwo do estrogenów syntetyzowanych w organizmie człowieka i z tego powodu mogą wykazywać podobne działanie. Postawiliśmy więc hipotezę, że izoflawony sojowe mogą stymulować eksport lipidów z wątroby, ponieważ mogą regulować ekspresję genu *PEMT* lub wpływać na aktywność innych genów, a mianowicie *AR*, *FAS*, *PPARG* i *SREBP1C*, które to regulują syntezę i metabolizm lipidów w organizmie. Głównym celem badania jest przetestowanie wpływu izoflawonów sojowych na akumulację lipidów w wątrobie. Szczegółowe cele badania obejmują:

1. Ocena, czy genisteina, daidzeina lub ekstrakt izoflawonów sojowych może aktywować transkrypcję genu *PEMT* lub innych genów zaangażowanych w proces akumulacji tłuszczu (*AR*, *FAS*, *PPARG* i *SREBP1C*) w pierwotnych hepatocytach szczura.
2. Zbadanie, czy dodatek genisteiny, daidzeiny lub ekstraktu izoflawonów sojowych do standardowej diety szczurów może wpływać na syntezę choliny w wątrobie poprzez aktywację genu *PEMT*.
3. Określenie, czy dodatek genisteiny, daidzeiny lub ekstraktu izoflawonów sojowych do standardowej diety szczurów może wpłynąć na gromadzenie się lipidów w wątrobie poprzez aktywację genu *PEMT*, ale także *AR*, *FAS*, *PPARG* i *SREBP1C*.

2. Metodologia projektu badawczego

W celu przeanalizowania mechanizmów działania izoflawonów sojowych, zaplanowano przeprowadzenie eksperymentu *in vitro* z użyciem pierwotnych hepatocytów szczura (Sprague-Dawley, samiec). Do hodowli komórkowych dodane zostaną genisteina, daidzeina oraz ekstrakt izoflawonów sojowych. Ekspresja genów *PEMT*, *AR*, *FAS*, *PPARG* i *SREBP1C*, jak również stężenia fosfatydylocholiny będą mierzone przed i po dodaniu fitoestrogenów. Aby poznać działanie izoflawonów w organizmie, przeprowadzone zostanie doświadczenie na modelu zwierzęcym. Osiemdziesiąt 8-tygodniowych samców szczurów Wistar będzie karmionych dietą z niedoborem choliny lub dietą kontrolną przez 4 okresy tygodni. Następnie każda grupa zostanie podzielona na 4 podgrupy: 1) kontynuująca spożycie tej samej diety, 2) karmiona dietą z dodatkiem genisteiny, 3) karmiona dietą z dodatkiem daidzeiny, 4) karmiona dietą z dodatkiem ekstraktu izoflawonów sojowych. Ten etap doświadczenia potrwa 8 tygodni. Poniższe analizy pozwolą nam określić, w jaki sposób izoflawony wpływają na syntezę endogennej fosfatydylocholiny oraz na gromadzenie się lipidów w wątrobie:

- pomiary poziomów transkrypcji genów *PEMT*, *AR*, *FAS*, *PPARG* i *SREBP1C*,
- w celu określenia statusu metabolicznego zwierząt zostaną zmierzone następujące parametry biochemiczne: glukoza na czczo, cholesterol całkowity, cholesterol HDL i LDL, triglicerydy, stężenie fosfatydylocholiny w wątrobie i osoczu oraz stężenie VLDL we krwi (ELISA); zostanie również oznaczona zawartość tłuszczu w próbkach kału (system Soxtec),
- badanie histologiczne wycinków wątroby.

3. Oczekiwany wpływ projektu badawczego na rozwój nauki

Ponieważ spożycie soi oraz produktów sojowych stale rośnie, prowadzenie badań dotyczących ich wpływu na organizm człowieka jest w pełni uzasadnione. Poprzednie badania wykazały, że spożycie soi może chronić przed stłuszczeniem wątroby, jednak mechanizmy tego działania nie zostały dotąd poznane. Koncepcje zaproponowane w tym projekcie nie były testowane nigdy wcześniej. Wyniki tego badania mogą więc zwiększyć podstawową wiedzę na temat metabolizmu, w szczególności na temat regulacji syntezy choliny oraz metabolizmu lipidów w wątrobie. Ze względu na odnotowywane zwiększenie spożycia produktów sojowych oraz suplementów na bazie soi, ale także rosnącą częstość występowania stłuszczenia wątroby, wyniki niniejszego badania mogą mieć też duże znaczenie praktyczne.