

EWA ŻERNICKA

WPLYW DOŚWIADCZALNEJ NIEDOCZYNNOCI I NADCZYNNOCI
TARCZYCY NA AKTYWNOŚĆ LIPAZY LIPOPROTEINOWEJ ORAZ
ZAWARTOŚĆ TRIACYLOGLICEROLI W MIĘŚNIACH SZCZURA W
SPOCZYNKU I PO WYSIŁKU FIZYCZNYM



ZS 199
H3066

Rozprawa doktorska

wykonana

w Zakładzie Fizjologii Stosowanej

Instytutu - Centrum Medycyny

Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Promotor:

Prof. dr hab. Hanna Kaciuba-Uściłko

Warszawa 1999

SPIS TREŚCI

1. Wykaz stosowanych skrótów	4
2. Wstęp	5
Lipoproteiny osocza	
Lipaza lipoproteinaowa	
Hormony tarczycy a metabolizm lipidów	
3. Założenia i cel pracy	23
4. Materiał i metody	26
Zwierzęta	
Przebieg doświadczenia	
Opaczenie hormonalne zwierząt	
Opaczenie we krwi	
Opaczenie trójglicerydów w surowicy krwi i mięśniach	
Opaczenie aktywności	
Przygotowanie zwierząt	
Opaczenie aktywności wewnątrzkomórkowej LPL	
Opaczenie zmiaru ^{14}C -TG-cholesterolu z krwi i ich wydobytu przez mięśnie	
Opaczenie zmiaru ^{14}C -TG-cholesterolu	
Porównanie zmiaru cholesterolu z krwi i ich wydobytu przez mięśnie	
Statystyczne opracowanie wyników	
5. Wyniki	35

Pani Profesor Hannie Kaciubie-Uściłko, mojemu nauczycielowi, składam serdeczne podziękowanie za wielką życzliwość, cierpliwość i wszechstronną pomoc okazaną w czasie powstawania tej pracy.

Serdecznie dziękuję Pani Profesor Krystynie Nazar i Panu Docentowi Leszkowi Budohoskiemu za pomoc i uwagi w czasie pisania pracy.

Dziękuję również Kolegom z Pracowni, bez udziału których praca ta nie mogłaby powstać.

SPIS TREŚCI

1. Wykaz stosowanych skrótów	4
2. Wstęp	5
Lipoproteiny osocza		
Lipaza lipoproteinowa		
Hormony tarczycy a metabolizm lipidów		
3. Założenia i cel pracy	25
4. Materiał i metody	26
Zwierzęta		
Przebieg doświadczeń		
Oznaczanie hormonów tarczycy		
Oznaczanie wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy		
Oznaczanie triacylogliceroli w surowicy krwi i mięśniach		
Oznaczanie aktywności lipazy lipoproteinowej (LPL) w mięśniach		
Przygotowanie substratu		
Oznaczanie aktywności zewnątrzkomórkowej, naczyniowej formy LPL		
Oznaczanie aktywności formy wewnątrzkomórkowej LPL		
Oznaczanie zaniku ^{14}C -TG-chylomikronów z krwi i ich wychwyty przez mięśnie		
Otrzymywanie znakowanych ^{14}C -TG-chylomikronów		
Pomiar tempa zaniku chylomikronów z krwi i ich wychwyty przez mięśnie		
Statystyczne opracowanie wyników		
5. Wyniki	35
Stężenie hormonów tarczycy w surowicy krwi szczurów z doświadczalnie wywołanym niedoborem bądź nadmiarem tych hormonów		

Stężenie WKT i TG w surowicy krwi szczurów z niedoborem lub nadmiarem T_4 i T_3

Aktywność dwóch form LPL w mięśniu płaszczkowatym i sercowym szczurów z

niedoborem i nadmiarem T_4 i T_3 we krwi

Wewnątrzmięśniowe stężenie TG w warunkach niedoboru i nadmiaru hormonów

tarczycy we krwi

Wpływ hormonów tarczycy na tempo zaniku ^{14}C -TG-chylomikronów z krwi i

wychwytu uwolnionych WKT przez mięśnie.

6. Dyskusja	55
7. Wnioski	75
8. Streszczenie	77
9. Piśmiennictwo	83

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Apo A,B,CII,E	apoproteiny A,B,CII,E
VLDL	lipoproteiny o bardzo małej gęstości
LDL	lipoproteiny o małej gęstości
IDL	lipoproteiny o pośredniej gęstości
HDL	lipoproteiny o dużej gęstości
HRE	fragment reagujący na hormon (hormone responding element)
THRE	fragment reagujący na hormon tarczycy (Thyroid Hormone Responding Element)
TR	receptor jądrowy hormonu tarczycy (Thyroid Receptor)
T₄	tyroksyna, tetrajodotyronina
T₃	trijodotyronina
rT₃	rewers trijodotyronina
LPL	lipaza lipoproteinowa
Z-LPL	zewnątrzkomórkowa, naczyniowa forma LPL
W-LPL	wewnątrzkomórkowa forma LPL
TG	triacylglicerole
WKT	wolne kwasy tłuszczowe

2. WSTĘP

Lipoproteiny osocza

Lipidy we krwi transportowane są w postaci rozpuszczalnych w wodzie kompleksów lipidowo-białkowych - lipoprotein. Drobiny te w zależności od wielkości i masy cząsteczkowej zawierają różne ilości triacylogliceroli (TG), fosfolipidów, wolnego i zestryfikowanego cholesterolu oraz białek zwanych apoproteinami. Chociaż sposób rozmieszczenia lipidów i białek w cząsteczce lipoproteinowej jest przedmiotem wielu badań, na ogół przyjmuje się model Dole i Hamlina (cyt. za Miller i Small, 1987) przedstawiający monomeryczną cząsteczkę złożoną z wewnętrznego, niepolarnego „rdzenia” lipidowego (głównie triacyloglicerole i estry cholesterolu) pokrytego otoczką zawierającą białka, fosfolipidy i wolny cholesterol. Apoproteiny, które stanowią od 1% do 50% masy cząsteczki pełnią nie tylko funkcję stabilizującą lecz biorą bezpośredni udział w metabolizmie lipoprotein poprzez wiązanie się z odpowiednimi receptorami błonowymi (Apo B, Apo E) lub regulując aktywność enzymów jako kofaktory (np. Apo CII). Okazało się, że funkcja lipoprotein jako transportera jodotyronin w osoczu wiąże się z obecnością apolipoprotein. Benvenga (1997) sugeruje nawet, że funkcja ta powinna znaleźć odzwierciedlenie w nazwie i proponuje termin „apo-tyreo-lipo-proteina”.

Na podstawie właściwości fizykochemicznych przyjęto tradycyjnie dzielić lipoproteiny na cztery główne grupy: chylomikrony, VLDL (Very Low Density Lipoproteins) czyli lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości, LDL (Low Density Lipoproteins) czyli lipoproteiny o niskiej gęstości oraz HDL (High Density Lipoproteins), lipoproteiny o dużej gęstości (Eisenberg i Levy 1975, Michajlik, Sznajderman 1986).

Spośród lipoprotein głównie chylomikrony i VLDL są zaangażowane w transporcie triacylogliceroli z miejsca ich wytwarzania do tkanek docelowych, jako że w

warunkach normalnej diety TG są głównym składnikiem tych lipoprotein. Chylomikrony, wytwarzane w enterocytach jelita cienkiego podczas aktywnej absorpcji tłuszczów pokarmowych składają się, u ssaków, z białek (1-2%) i lipidów (98-99%), z których 90% stanowią TG, 1-2% estry cholesterolu, 1% wolny cholesterol oraz 5-8% fosfolipidy. Są one uwalniane z komórki na drodze egzocytozy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, z której przechodzą do chłonki, a następnie za pośrednictwem układu limfatycznego przedostają się do krwi. VLDL syntezowane w komórkach wątroby i jelita zawierają więcej białek (7-10%), a spośród lipidów TG stanowią 65%, estry cholesterolu 12%, wolny cholesterol 5% a fosfolipidy 18% (Miller, Small 1988). Na powstawanie tych „cząsteczek bogatych w triacyloglicerole” główny wpływ ma ilość wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) egzo- i endogennych dostępnych dla wątroby i jelita cienkiego. Stwierdzono, że o ile wytwarzanie i uwalnianie VLDL jest procesem ciągłym, to chylomikrony syntezowane są głównie w okresie postabsorpcyjnym.

Równocześnie z syntezą składników lipidowych, w rybosomach komórek wątroby i jelita wytwarzane są apoproteiny, które jak Apo B nie tylko stanowią integralną część cząsteczki ale są niezbędne dla prawidłowej syntezy i sekrecji obu lipoprotein. Skład apoprotein VLDL i chylomikronów jest zbliżony. Poza Apo B na ich powierzchni występują apoproteiny A, C i E, które syntetyzowane są w komórkach wątroby i jelita, bądź pochodzą z innych lipoprotein.

Nowopowstałe chylomikrony i VLDL ulegają dalszym przeobrażeniom w układzie krążenia, w trakcie których następuje wymiana składników pomiędzy cząsteczkami lipoprotein oraz erytrocytami i leukocytami czy innymi klasami lipoprotein. W czasie tego procesu zwiększa się między innymi zawartość cholesterolu w chylomikronach i VLDL (Miller i Small, 1988) oraz przyłącza się pochodząca z HDL apoproteina C II. Tak aktywowane cząsteczki docierają do tkanek pozawątrobowych

(głównie tłuszczowej i mięśniowej), gdzie na powierzchni śródbłonka naczyniowego zachodzi proces delipidacji lipoprotein przy udziale lipazy lipoproteinowej (LPL). W wyniku współdziałania LPL i Apo C II około 75% TG ulega hydrolizie do WKT i glicerolu. Znaczna część powstałych kwasów tłuszczowych zostaje wychwycona przez otaczające tkanki. Równocześnie z tym procesem następuje hydroliza pewnej części fosfolipidów warstwy powierzchniowej cząsteczki.

Proces delipidacji lipoprotein jest wielostopniowy - podczas kolejnych interakcji ich cząsteczek z LPL powstają coraz mniejsze drobiny o zmienionym składzie lipidowym i białkowym. Podczas hydrolizy triacylogliceroli chylomikrony i duże cząsteczki VLDL tracą również część białkową, głównie Apo A i C, oraz część fosfolipidów i tworzą tzw. chylomikrony lub VLDL „resztkowe” (remnants). Te „resztkowe” lipoproteiny, bogate w estry cholesterolu i fosfolipidy, zawierają apoproteiny B i E dzięki którym zostają rozpoznawane i związane przez receptory błonowe hepatocytów (Apo E receptory) a następnie pobrane do wnętrza komórki na drodze endocytozy. W końcowym etapie tego procesu dochodzi do przemian fosfolipidów i estrów cholesterolu w wątrobie (Shephard i Packard 1987, Hussain i wsp. 1996).

Nieco odmiennie przedstawia się metabolizm VLDL o średnich i małych cząsteczkach, w wyniku którego przy współudziale LPL, acylotransferazy lecytynocholesterolowej (LCAT) oraz białek wymieniających estry cholesterolu i TG (Havel 1984, Havel 1988) zachodzi konwersja do IDL (lipoprotein o pośredniej gęstości), które szybko ulegają przekształceniu do LDL.

Lipaza lipoproteinowa /LPL/

W 1943 r. w Science ukazało się krótkie doniesienie Hahna (1943), który przy okazji określania liczby krążących erytrocytów u psa z wyraźnymi objawami lipemii podał

zwierzęciu krew z heparyną jako substancją przeciwzakrzepową a następnie już tylko heparynę rozpuszczoną w roztworze soli fizjologicznej. W ciągu 3 do 5 minut lipemiczny obraz krwi całkowicie zaniknął. Był to pierwszy udokumentowany opis tzw „czynnika przejaśnienia” (clearing factor). Badania dotyczące tego zagadnienia rozwinęły się jednak dopiero w dziesięć lat później, kiedy to Anderson i Fawcett (cyt. za Robinson 1987) zasugerowali, że „czynnik przejaśnienia” jest uwalniany z tkanek pod wpływem heparyny, Anfinsen i wsp. (cyt. za Robinson 1987) przedstawili dowody na to, że zachodzący proces jest reakcją enzymatyczną, natomiast Korn (1955) wykazał, że enzymem zaangażowanym w niej jest lipaza, która poza surowicą krwi występuje w szeregu tkanek pozawątrobowych m. in. w sercu i tkance tłuszczowej i którą określił jako *lipazę lipoproteinową*. Nazwę tę ostatecznie przyjęto w roku 1956 w Brukseli na konferencji „Lipidy Krwi i Czynnik Przejaśniający”.

Lipaza lipoproteinowa (LPL, EC 3.1.1.34) jest głównym enzymem hydrolizującym wiązania estrowe triacylogliceroli i fosfolipidów zawartych w krążących we krwi chylomikronach i VLDL-ach, udostępniając w ten sposób kwasy tłuszczowe i 2-monoacyloglicerole do wykorzystywania jako źródło energii lub materiał zapasowy otaczającym tkankom (Cryer 1981, Quinn i wsp.1982, Wang i wsp.1992). Miejscem działania tego enzymu jest światło naczyń kapilarnych, gdzie występuje on na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej w śródbłonku naczyniowym do której przymocowany jest poprzez wiązanie z polisacharydowymi łańcuchami proteoglikanów podobnymi do heparyny (siarczan heparanu) (Chang i wsp. 1981).

LPL wspólnie z lipazą wątrobową i trzustkową należą do jednej genowej rodziny białek enzymatycznych (Persson i wsp. 1989, Kirchgessner i wsp. 1989). LPL jest enzymem powszechnie występującym w większości tkanek, tak u ludzi jak i u zwierząt. Głównym miejscem syntezy lipazy lipoproteinowej jest tkanka tłuszczowa (Eckel 1987),

mięśnie szkieletowe i serce (Borensztajn 1987) oraz gruczoł mleczny (Scow i Chernick 1987), stwierdzono jednak obecność mRNA właściwego dla LPL również m.in. w nerce, śledzionie, płucach, wątrobie, mózgu i makrofagach, (Kichgessner i wsp.1987, Goldberg i wsp. 1989, Vilaro i wsp.1988, Burgaya i wsp.1989, Goldman i Sopher 1989, O'Brien i wsp. 1992).

Badania ostatnich kilku lat pozwoliły na lepsze poznanie mechanizmów syntezy, translokacji i kontroli działania tego enzymu. Na podstawie oznaczeń mRNA LPL wydaje się, że głównym miejscem syntezy tego enzymu są komórki parenchymalne (Olivecrona i wsp. 1991, Braun i Severson 1992), a w mięśniach wyłącznie miocyty (Blanchette-Mackie i wsp. 1989, Camps i wsp. 1990). Enzym syntetyzowany jest w szorstkim retikulum sarkoplazmatycznym, gdzie prawdopodobnie podlega szeregowi przeobrażeń prowadzących do powstania dojrzałej cząsteczki. Jednym z ważniejszych procesów dojrzewania cząsteczki LPL jest glikozylacja i usunięcie końcowej reszty glukozowej łańcucha oligosacharydowego a następnie transport enzymu do aparatu Golgiego (Simsolo i wsp.1992, Braun i Severson 1992, Ben-Zeev i wsp. 1992). Przypuszcza się, że retikulum sarkoplazmatyczne może być również, obok lizosomów, miejscem wewnątrzkomórkowej degradacji enzymu (Vannier i Ailhaud 1989, Semb i Olivecrona, 1987). Od miejsca syntezy w retikulum do miejsca działania w świetle naczyń włosowatych cząsteczka LPL musi przejść przez komórkę, przestrzeń międzykomórkową oraz ścianę naczyń kapilarnych: szlak ten nie został jednak do końca poznany. Blanchette-Mackie i wsp. (1989) zaproponowali model transportu enzymu wzdłuż mostów utworzonych przez łańcuchy siarczanu heparanu, łączących powierzchnię komórek i śródbłonek naczyń kapilarów. Zdaniem tych badaczy drugą możliwą drogą jest przesuwanie się cząsteczki LPL wzdłuż błony podstawnej, jako że

blona podstawna sąsiadujących komórek tworzy continuum (Scow i Blanchette-Mackie 1992).

Uwalnianie enzymu z komórki następuje w sposób spontaniczny lub regulowany. Spontaniczna sekrecja to proces uwalniania LPL natychmiast po powstaniu bez uprzedniej akumulacji wewnątrzkomórkowej, a jej tempo zależy wyłącznie od tempa translacji. Sekrecja regulowana zachodzi wtedy gdy nowopowstała cząsteczka białka enzymatycznego jest magazynowana w komórce w pęcherzykach wydzielniczych i uwalniana w odpowiedzi na bodziec (Braun i Severson 1992). Choć większość badaczy zgadza się, że nowo zsyntetyzowana LPL transportowana jest szlakiem wewnątrzkomórkowym na powierzchnię komórki, a następnie szybko uwalniana, kontrowersje wzbudza miejsce i sposób magazynowania lub degradacji cząsteczki enzymu (Olivecrona i wsp.1993). Według Cisara i wsp. (1989) cała pula nowopowstałego enzymu jest przenoszona na powierzchnię komórki, wiązana z siarczanem heparanu śródbłonna naczyniowego i uwalniana do krwioobiegu lub internalizowana (Saxena i wsp.1991), w następstwie czego ulega degradacji bądź zostaje ponownie przeniesiona na powierzchnię błony komórkowej. Wydaje się, że ten skomplikowany sposób uwalniania, magazynowania i degradacji LPL w komórce może mieć na celu m.in. utrzymanie puli wewnątrzkomórkowej, nieaktywnej LPL na dosyć wyrównanym poziomie. Wielu badaczy uważa, że właśnie szlak prowadzący od miejsca syntezy do uwolnienia na zewnątrz komórki jest głównym miejscem regulacji aktywności lipazy lipoproteinowej (Braun i Severson 1992). Z uwagi na to, że LPL jest syntetyzowana i magazynowana w komórce, a hydrolizuje TG w świetle naczyń kapilarnych przyjęto podział tego enzymu na dwie formy: formę wewnątrzkomórkową, nieaktywną, gotową do uwolnienia (W-LPL, intracellular LPL) i zewnątrzkomórkową,

aktywną, uwalnianą heparyną (Z-LPL, extracellular LPL) (Nilsson-Ehle i wsp. 1976, Budohoski 1985, Nikkila 1987, Borensztajn 1987, Ben-Zeev i wsp. 1981).

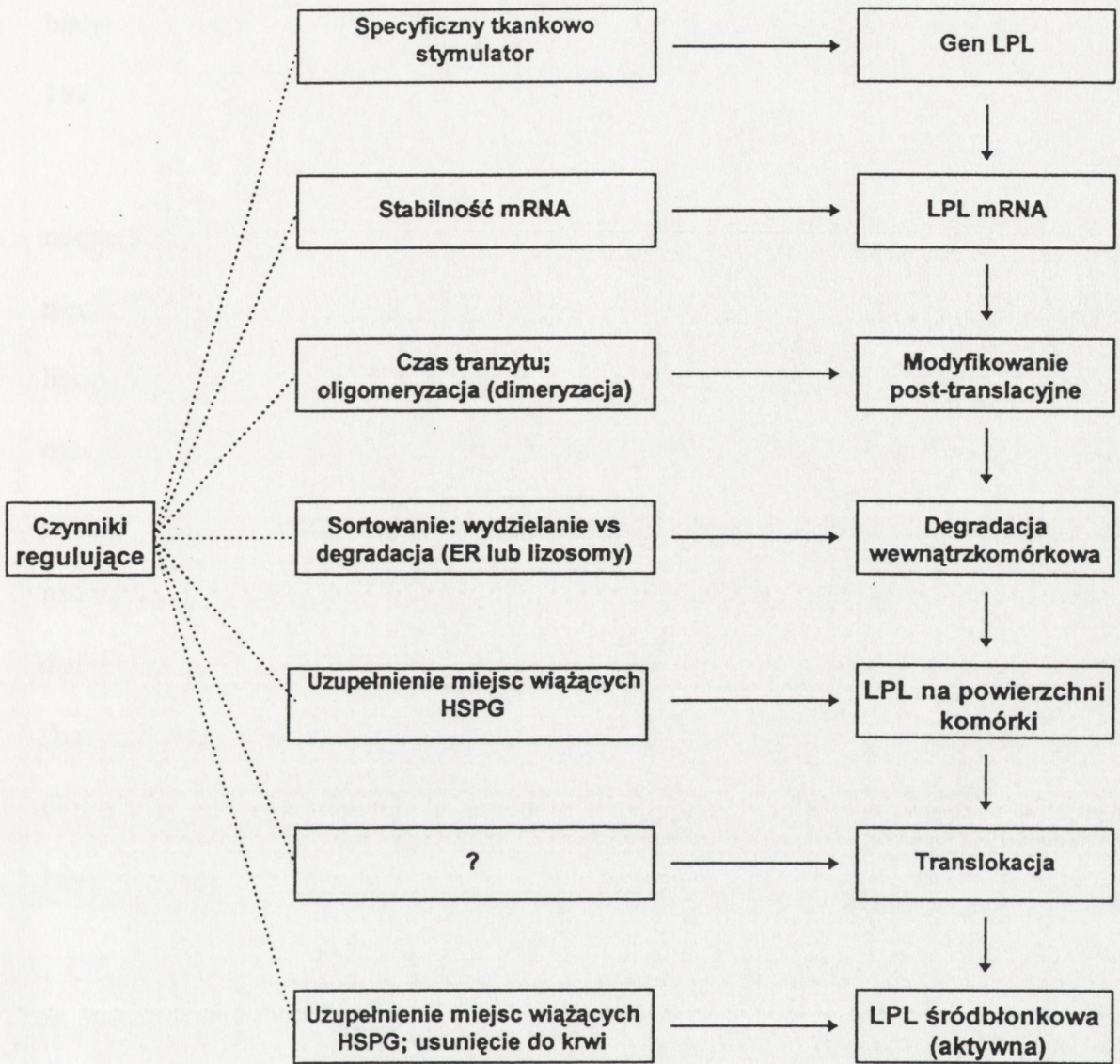
Aktywna cząsteczka LPL to glikoproteina o masie cząsteczkowej 55-61 kDa występująca w postaci mało stabilnego homodimeru, który łatwo dysocjuje do nieaktywnego monomeru (Olivecrona i Bengtsson-Olivecrona 1987, Soteriou i Cryer 1993). LPL posiada 6 domen funkcyjnych: (1) białko sygnałne składające się z 27 aminokwasów, (2) miejsce katalityczne, (3) miejsce interakcji z apo-CII, (4) miejsce wiążące lipidy na granicy faz (lipid interfacial binding site), umożliwiające interakcję z drobinami lipoprotein, (5) miejsce wiążące polianiony, m. in. służące do połączenia z siarczanem heparanu oraz (6) domenę dla niekowalencyjnych oddziaływań między podjednostkami (Olivecrona i Bengtsson-Olivecrona 1987, Taskinen i Kuusi 1987). Cryer (1985) wyróżnia ponadto miejsce oddziaływania LPL z detergentami lub długocząściowymi kwasami tłuszczowymi, różne od miejsca wiążącego lipidy na granicy faz.

Precyzyjna regulacja aktywności zewnątrzkomórkowej, „czynnej” formy LPL jest niezbędna dla kontroli katabolizmu TG i dostępności WKT. Regulacja aktywności zewnątrzkomórkowej LPL jest procesem złożonym, w którym mogą odgrywać rolę następujące elementy: (1) tempo syntezy enzymu, (2) ciągła regulacja wymiany między miejscami wiążącymi w śródbłonku naczyniowym, (3) recyrkulacja enzymu (Saxena i wsp. 1989, 1990a), (4) zniesienie aktywacji przez apo CII czy wreszcie (5) wpływ lokalnego stężenia uwolnionych WKT bezpośrednio na aktywność enzymu (Quinn i wsp. 1982) lub pośrednio poprzez działanie na miejsca wiążące w śródbłonku (Saxena i Goldgerg 1990).

Aktywność LPL podlega kontroli przez wiele czynników fizjologicznych i patofizjologicznych, co wiąże się z koniecznością współdziałania tych czynników w miejscu syntezy jak i dojrzewania i transportu enzymu do śródbłonka naczyniowego

(Ryc. 1)(Braun i Severson 1992, Doolittle i wsp.1990, Ong i wsp. 1988, Simsolo i wsp. 1992). Dobrze poznane są zmiany aktywności LPL w tkance tłuszczowej i mięśniowej w stanie nasycenia i głodu. Stwierdzono, że w stanie nasycenia aktywność LPL tkanki tłuszczowej jest bardzo wysoka co pozwala na kierowanie WKT uwolnionych w wyniku hydrolizy TG-chylomikronów do tłuszczu zapasowego, podczas głodu natomiast aktywność enzymu jest znacząco obniżona (Doolittle i wsp. 1990, Ladu i wsp. 1991, Bergo i wsp. 1996, Zechner 1997). W mięśniach szkieletowych i sercu stwierdzono zaś, odwrotnie niż w tkance tłuszczowej, że w czasie głodu, kiedy organizm korzysta ze zgromadzonych zapasów lipidowych aktywność LPL utrzymuje się na niezmiennym poziomie lub wzrasta, co pozwala na wykorzystywanie przez te tkanki powstających WKT jako źródła energii (Bergo i wsp.1996, Olivecrona i wsp. 1995, Ladu i wsp 1991, Ong i wsp. 1994). Jest rzeczą oczywistą, że skoordynowana regulacja aktywności LPL w tkance tłuszczowej i mięśniowej jest bardzo istotna dla utrzymania homeostazy organizmu. Wyniki badań wskazują, że regulacja aktywności LPL *feeding/fasting* tak w tkance tłuszczowej jak i w mięśniach zachodzi głównie na poziomie potranslacyjnym ale regulacja na poziomie transkrypcji może mieć również znaczenie, zwłaszcza w tkance tłuszczowej (Doolittle i wsp. 1990, Braun i Severson 1992, Ladu i wsp. 1991, Enerback i Gimble 1993). Przypuszcza się również, że takie hormony jak insulina, glukagon czy glukokortykoidy mogą brać udział w „pokarmowej” regulacji aktywności LPL (Eckel 1987, Borensztajn 1987, Enerback i Gimble 1993).

Aktywność LPL w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym jest stosunkowo wysoka. Szczegółowe badania wykazały, że aktywność enzymu zależy od typu włókien mięśniowych. Jest ona najwyższa w mięśniach o przewodze włókien czerwonych, wolnokurczliwych, oksydacyjnych (ST I), a najniższa w mięśniach o przewodze włókien



Rycina 1.

Potencjalne miejsca i mechanizmy działania czynników regulacyjnych LPL.

HSPG - proteoglikan siarczanu heparyny

ER - retikulum endoplazmatyczne

Rycina wg Braun i Severson, 1992

białych, szybko kurczliwych, glikolitycznych (FT IIb) (Linder i wsp. 1976, Tan i wsp. 1977).

Ze względu na to, że całkowita masa mięśni stanowi ok. 40% masy ciała rola mięśniowej LPL w usuwaniu triacylogliceroli z krwi jest niezwykle istotna. Sądzone do niedawna, że z wolnych kwasów tłuszczowych uwolnionych w wyniku hydrolizy lipoprotein osocza tylko część jest natychmiast wychwytywane przez komórki otaczających mięśni, reszta natomiast wiąże się z albuminą i zostaje rozprowadzona przez krew (Bergman i wsp. 1971). Badania prowadzone na transgenicznym myszom z nadekspresją LPL w mięśniach szkieletowych pokazały, że mięśnie te mają niezwykle dużą zdolność do wychwytywania WKT pochodzących z hydrolizy TG-lipoprotein (Levak-Frank i wsp. 1995) i wznowiły dyskusję czy aktywność LPL w danej tkance determinuje miejsce przemian metabolicznych uwolnionych WKT (Olivecrona i wsp. 1997).

Oprócz wspomnianej wcześniej zmiany aktywności lipazy wynikającej z przejścia ze stanu głodu w stan nasycenia pokarmowego, aktywność tego enzymu w mięśniach determinowana jest przez szereg innych czynników. W badaniach przeprowadzonych zarówno u ludzi jak i u zwierząt stwierdzono, że aktywność LPL w mięśniach jest na ogół wyższa po diecie bogato-tłuszczowej niż po diecie bogato-węglowodanowej (Borensztajn 1987, Fernandez i wsp. 1995, Kiens i wsp. 1987). Może to wskazywać, że zawartość tłuszczu w diecie jest jednym z czynników wpływających na zdolność tkanki mięśniowej do wykorzystywania krążących triacylogliceroli. Podobnie stwierdzono, że dłuższa ekspozycja do niskiej temperatury otoczenia (2°-4°C) powoduje istotny wzrost aktywności enzymu w mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym (Rogers i Robinson 1974; Miller i Oscai 1984; Goubern i Portet 1981). Kotlar i Borensztajn (1977)

opisali zmienność dobową aktywności LPL w mięśniach, która nie wynikała jednak bezpośrednio z cyklu światło : ciemność..

Wpływ hormonów na aktywność LPL w tkance tłuszczowej jest stosunkowo dobrze poznany, istnieje natomiast dużo mniej danych dotyczących hormonalnej regulacji tego enzymu w mięśniach szkieletowych i sercu. Insulina, która istotnie podwyższa ilość i aktywność LPL w tkance tłuszczowej (Enerback i Gimble 1993; Semenkovich i wsp.1989), powoduje obniżenie aktywności LPL w mięśniach szkieletowych zarówno białych jak i czerwonych (Górski i Stankiewicz-Choroszuca 1982, Kiens i wsp.1989), prawdopodobnie poprzez wpływ na tempo syntezy tego enzymu (Eckel 1989). Wyniki badań dotyczących wpływu insuliny na aktywność LPL w mięśniu sercowym są kontrowersyjne. W mięśniu sercowym szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą stwierdzano zarówno obniżoną jak i podwyższoną aktywność LPL oraz normalne jej wartości (O'Looney i Vahouny 1987, Tavangar i wsp 1992). Wyniki badań prowadzonych *in vitro* zdają się wskazywać, że poza insuliną inne czynniki aktywne *in vivo* jak np. inne hormony mogą uczestniczyć w regulacji aktywności LPL mięśnia sercowego w cukrzycy (Braun i Severson 1992a, Enerback i Gimble 1993).

Stymulujący wpływ amin katecholowych na aktywność całkowitą LPL w mięśniach szkieletowych wykazano zarówno pod wpływem krótkotrwałego (Górski i Stankiewicz-Choroszuca 1982) jak i długotrwałego stosowania adrenaliny, noradrenaliny bądź β -adrenergicznych agonistów (Friedman i wsp. 1986, Deshaies i wsp. 1993). W kardiomiocytach stwierdzono pod wpływem adrenaliny równoczesny wzrost tempa syntezy LPL, wzmożoną jej glikozylację oraz wzrost aktywności formy tego enzymu związanej ze śródbłonkiem naczyniowym. Wskazuje to na zaangażowanie czynników translacyjnych i po-translacyjnych w procesie regulacyjnym (Friedman i wsp. 1986).

Do innych czynników hormonalnych wpływających na syntezę, degradację i aktywność LPL należą także sterydy, hormon wzrostu, glukagon, prolaktyna i hormony tarczycy (Borensztajn 1987, Speake i wsp. 1985, Enerback i Gimble 1993). Rola tych ostatnich zostanie omówiona w podrozdziale dotyczącym wpływu stanu czynnościowego tarczycy na metabolizm lipidów.

Wpływ czynników sterydowych na aktywność LPL dość dobrze poznano dzięki badaniom na szczurach. Stwierdzono w nich, że wpływ podawania glukokortykoidów zależy od stanu odżywienia organizmu. I tak u zwierząt nakarmionych glukokortykoidy powodują wzrost aktywności LPL w mięśniach szkieletowych i w sercu (Krausz i wsp. 1981) oraz obniżenie aktywności tego enzymu w tkance tłuszczowej, czemu towarzyszy zmniejszenie mRNA (Ong i Kern 1989, Ong i wsp. 1992). U szczurów głodzonych przez 24 godz. wykazano natomiast wzrost aktywności LPL po podaniu glukokortykoidów (Ashby i Robinson 1980). W badaniach innych autorów stwierdzono ponadto, że hormon wzrostu pobudza proces transkrypcji LPL oraz zwiększa aktywność enzymu (Pradines-Figueres i wsp. 1990), z którym to procesem antagonizują glukokortykoidy (Pradines-Figueres i wsp. 1990a).

Kolejnym hormonem, który może być zaangażowany w kontrolę syntezy czy aktywności LPL jest glukagon. Wyniki badań nie są tu jednak jednoznaczne: opisywano bowiem zarówno wzrost aktywności enzymu w mięśniu sercowym po podaniu glukagonu (Borensztajn i wsp. 1982) jak i brak jakiegokolwiek reakcji na ten hormon w mięśniach szkieletowych i w sercu (Rault i wsp. 1974, Górski i Stankiewicz-Choroszuca 1982).

Do czynników modyfikujących aktywność LPL w mięśniach szkieletowych i sercu należy również wysiłek fizyczny (Nikkila 1987). W następstwie jednorazowego wysiłku fizycznego stwierdzano tak u ludzi jak i u zwierząt wzrost aktywności LPL w

mięśniach szkieletowych i sercu (Kozłowski i wsp. 1979, Budohoski i wsp. 1982, Budohoski 1985, Nikkila i wsp. 1963, Taskinen i wsp. 1980a, Ladu i wsp. 1991a, Seip i wsp. 1995), jak również brak zmian (Barakat i wsp. 1981, Kiens i wsp. 1989) czy nawet obniżenie aktywności enzymu (Lithell i wsp. 1979, Paulin i wsp. 1991, Paulin i Deshaies 1992). Wydaje się, że te obserwowane różnice w aktywności powysiłkowej LPL mogą zależeć od wielu czynników, m.in. od rodzaju stosowanego wysiłku, jego intensywności i czasu trwania. Zmianom aktywności LPL w mięśniach po jednorazowym wysiłku towarzyszy obniżenie aktywności enzymu w tkance tłuszczowej (Nikkila 1987). Trening prowadzi na ogół do wzrostu aktywności LPL zarówno w mięśniach szkieletowych jak i w tkance tłuszczowej (Nikkila i wsp. 1978, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1981, Bagby i wsp. 1986, Hamilton i wsp. 1998), chociaż w niektórych pracach nie stwierdzono różnic w aktywności enzymu między grupami zwierząt nietrenujących i trenowanych (Nikkila 1987 praca przeglądowa). Trening wytrzymałościowy spośród wielu zmian powoduje wzrost gęstości kapilar w mięśniach szkieletowych (Saltin i Golnick 1983, Klens i wsp. 1993). Zmiany te wskazują na wzrost potencjalnych możliwości wykorzystywania TG osocza jako substratu energetycznego przez mięśnie pracujące podczas i po treningu. W mięśniach niepracujących nie stwierdzono zmian w aktywności LPL w czasie treningu (Hamilton i wsp. 1998).

LPL związana ze śródbłonkiem naczyniowym może łatwo oddysocjować pod wpływem heparyny i znaleźć się w krwioobiegu. W normalnych warunkach ilość enzymu w surowicy krwi jest stosunkowo niewielka choć stała (Peterson i wsp. 1985), okres półtrwania wynosi ok. 40 min. a 60 % enzymu zostaje natychmiast wychwycone przez wątrobę (Wallinder i wsp. 1979, Wallinder i wsp. 1984), gdzie enzym jest bardzo powoli degradowany (Wallinder i wsp. 1984, Chajek-Shaul i wsp. 1988). Niewykluczone jest również, że LPL w wątrobie może odgrywać aktywną rolę (Vilaro i wsp. 1988).

Oprócz omówionej powyżej, klasycznej roli LPL stosunkowo niedawno wykazano, że enzym ten pośredniczy w wiązaniu lipoprotein do proteoglikanów (Eisenberg i wsp. 1992) i wiążąc się z białkami receptora LDL promuje komórkowy wychwyty lipoprotein różnego typu (Beisiegel i wsp. 1991, Chappell i wsp. 1992, Beisiegel and Heeren 1997).

Hormony tarczycy a metabolizm lipidów

Głównymi substancjami wydzielanymi przez gruczoł tarczowy są tyroksyna (3,3',5,5'-tetrajodotyronina, T_4), w mniejszej ilości T_3 (3,3',5 - trijodotyronina) i rT_3 (3,3',5'-trijodotyronina, rewers T_3) a u ssaków również kalcytonina, hormon obniżający stężenie wapnia we krwi. Uwolnione z tarczycy T_4 i T_3 trafiają do krwi, gdzie znaczna ich część wiąże się z białkami osocza [globuliną wiążącą tyroksynę TBG, prealbuminą wiążącą tyroksynę (TTR, transthyretin), albuminą i lipoproteinami] a pozostałe pozostają niezwiązane i tworzą pulę hormonów aktywnych fizjologicznie. Stwierdzono, że spośród jodotyronin tarczyca wydziela głównie tyroksynę, natomiast T_3 i rT_3 są produktami monodejodynacji w tkankach pozataarczycowych (Macke-Nauman 1990, Ambroziak i Nauman, 1998). Obecnie przyjmuje się, że to właśnie T_3 jest właściwym, aktywnym hormonem tarczycy natomiast tyroksyna pełni głównie, jeśli nie wyłącznie, rolę prohormonu (Oppenheimer i wsp. 1996, Surks i Oppenheimer 1977). Wzrastająca liczba dowodów wskazuje na to, że większość, jeśli nie wszystkie znaczące odpowiedzi komórkowe kontrolowane przez hormony tarczycy wynikają z ciągu molekularnych zdarzeń zapoczątkowanych przyłączeniem T_3 do receptora w komórce docelowej (Brent 1991, Oppenheimer i wsp. 1996, De Groot 1996).

Receptory trijodotyroniny (TR) należą wraz z m.in. receptorami kwasu retinowego i witaminy D do dużej rodziny receptorów, których cechą charakterystyczną jest stała obecność w jądrze komórkowym (Lazar 1993; Mangelsdorf i wsp. 1995). Receptor ten jest białkiem regulatorowym i podobnie jak wszystkie białka tej rodziny posiada wiele funkcjonalnych domen, wśród nich brzegową domenę karboksylową zawierającą region wiążący ligand (T_3) oraz domenę wiążącą DNA (Brent 1994, Oppenheimer i wsp. 1996, DeGroot 1996). Ta ostatnia domena to fragment ok. 70 aminokwasów, w którym wyróżniono dwa „palce cynkowe” : obszar palca 1 (P box) odpowiadający za rozpoznanie elementu reagującego HRE (hormone responding element) DNA w promotorze genu docelowego oraz obszar 2 (D box) istotny dla dimeryzacji receptorów (Freedman 1992). Zdolność receptorów T_3 do regulacji ekspresji określonych genów zależy od tych krótkich sekwencji aminokwasów.

Tak więc, aby zainicjować efekt działania hormonu tarczycy, T_3 wchodzi do komórki docelowej lub jest w niej wytwarzana, szybko przemieszcza się do jądra komórkowego gdzie reaguje z miejscem wiążącym na białku receptorowym ($TR\alpha$ lub $TR\beta$) i indukuje zmiany konformacyjne (Forrest i wsp. 1990). Te z kolei wpływają na tempo transkrypcji genu zawierającego THRE (Thyroid Hormone Responding Element). Istnieją dwie główne klasy takich genów, dodatnio lub ujemnie regulowane przez T_3 . Taki genowy kompleks TR- T_3 -THRE spełnia wszystkie kryteria wymagane dla ligandu o wysokim powinowactwie, indukującego efekty działania T_3 i pozwala zrozumieć w jaki sposób różne geny mogą być stymulowane w wielu kierunkach w tej samej komórce (DeGroot 1996).

Już dawno zaobserwowano że stan czynnościowy tarczycy wpływa na siłę skurczu i tempo rozkurczu mięśni. Uwidacznia się to szczególnie wyraźnie w mięśniu sercowym, w którym pod wpływem podwyższonego stężenia hormonu tarczycy wzrasta

zarówno siła jak i szybkość skurczów. Niedobór hormonu ma wpływ odwrotny: obniża się kurczliwość i spowolnieniu ulega akcja serca. Zmiany te wynikają z regulacji przez T_3 genów odpowiedzialnych za syntezę określonych izoform ciężkich łańcuchów miozynowych (Woeber, 1992, Dillmann 1990) oraz wychwyt i rozmieszczenie jonów wapnia [Ca^{2+}]w retikulum sarkoplazmatycznym i hydrolizę ATP zależną od wapnia (Rohrer i Dillman 1989; Arai i wsp. 1991).

Jedną z pierwszych obserwacji wskazujących na wpływ stanu czynnościowego tarczycy na metabolizm lipidów było stwierdzenie hipercholesterolemii we krwi w stanie niedoczynności tarczycy (Mason i wsp. 1930; Peters i Man 1950). U podstaw tego zjawiska leży prawdopodobnie wpływ T_3 na metabolizm lipoprotein, zwłaszcza IDL i LDL, syntezę cholesterolu i regulację metabolizmu lipidów żółciowych (Abrams i Grundy 1981).

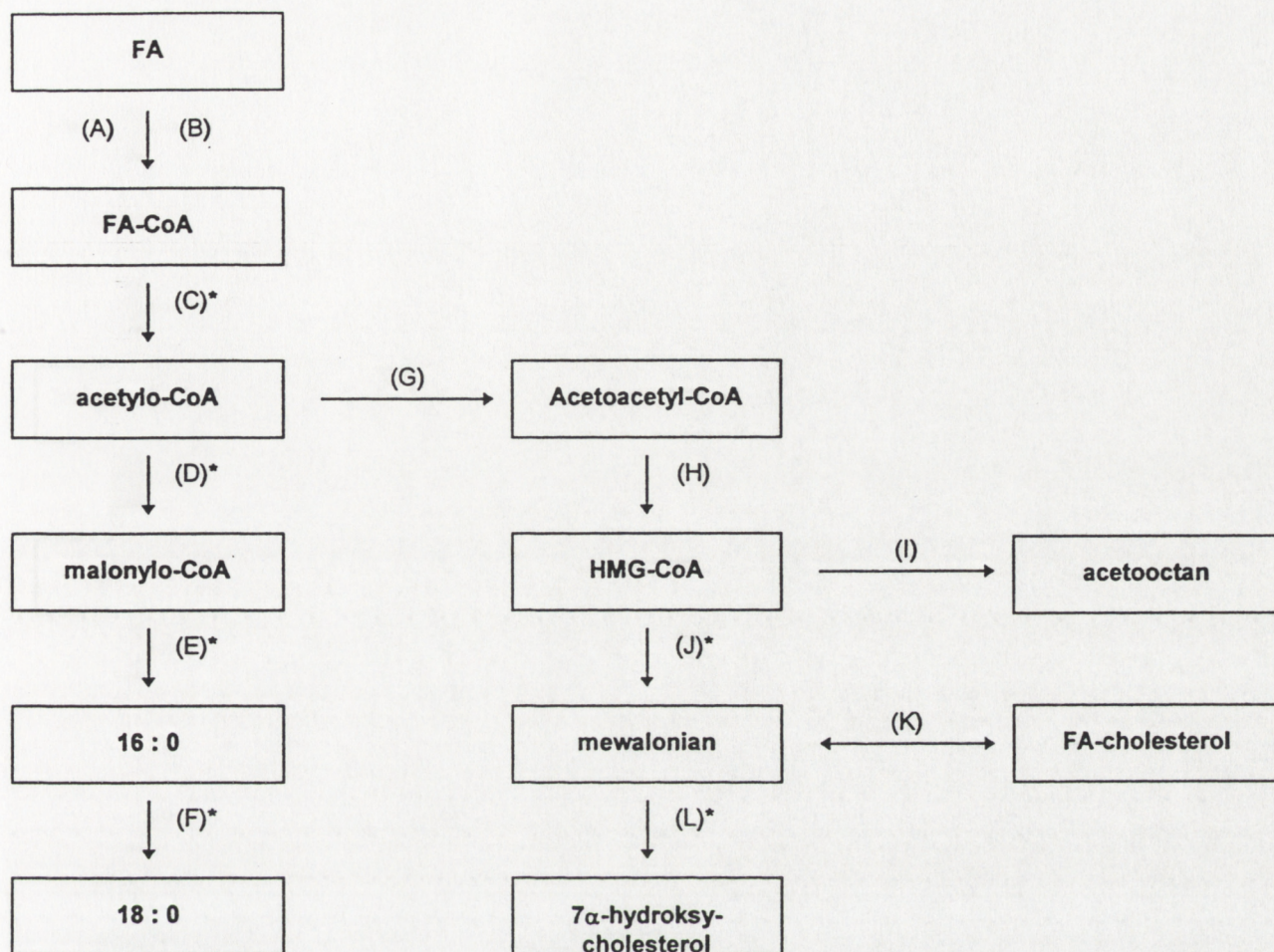
W następnych latach stwierdzono, że stan czynnościowy tarczycy ma wpływ na niemal wszystkie szlaki metabolizmu lipidów w organizmie. Wykazano np., że wzrost stężenia trijodotyroniny we krwi stymuluje lipolizę triacylogliceroli zapasowych i powoduje wzmożoną oksydację kwasów tłuszczowych, równocześnie pobudzając lipogenezę. Zdaniem Oppenheimera i wsp. (1991) to właśnie ten ostatni proces jest stymulowany w pierwszej kolejności i zmiany w aktywności takich enzymów jak dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu, dehydrogenaza jabłczanowa czy syntetaza kwasów tłuszczowych indukują wtórnie zmiany procesów lipolitycznych. Pod kontrolą T_3 znajdują się więc równocześnie procesy anaboliczne i kataboliczne, toteż utrzymanie optymalnego stężenia tego hormonu jest niezbędne dla zachowania homeostazy lipidowej w organizmie.

Hoch (1988) w swojej pracy przeglądowej podkreśla rolę, jaką odgrywa stan czynnościowy tarczycy w regulacji ilości, tempa syntezy czy aktywności poszczególnych

enzymów szlaków przemian tłuszczowych - szczególnie w metabolizmie kwasów tłuszczowych i cholesterolu (Ryc.2) czy konwersji glicero-3-fosforanu do triacylogliceroli i fosfolipidów (Ryc.3).

Trijodotyronina jako hormonalny regulator metabolizmu lipidów współdziała z innymi hormonami takimi jak np. noradrenalina, glukagon , insulina czy ACTH. To współdziałanie, określane często jako efekt ułatwiający (permissive effect) może być m.in. wynikiem wpływu hormonu tarczycy na cyklazę adenylową w błonach komórkowych , fosforylację lipazy hormono-wrażliwej (Hoch, 1988) czy strukturę fosfolipidową błon komórkowych (Tata 1968, 1970).

Jak wspomniano wcześniej, przy zmianach stanu czynnościowego tarczycy stwierdzono zmiany w syntezie TG w tkankach a także w ilości i składzie krążących lipoprotein. Znajduje to odzwierciedlenie w zmianach stężenia i tempa zaniku triacylogliceroli osocza (Roncari i Murphy 1975; Nikkila i Kekki 1972; Meyer i wsp.1989). Tempo zaniku TG osocza związane jest na ogół z aktywnością lipazy lipoproteinowej (Mackie i wsp. 1980), można więc oczekiwać, że hormon tarczycy jest jednym z czynników regulujących przebieg tego procesu poprzez wpływ na aktywność LPL. Nieliczne badania z tego zakresu dostarczyły niejednoznacznych danych. W stanie doświadczalnie wywołanej niedoczynności tarczycy stwierdzono bowiem zarówno zwiększenie aktywności całkowitej LPL w mięśniach szkieletowych (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980; Hansson i wsp. 1983) jak i obniżenie aktywności tego enzymu (Mallov i Alousi 1967), wykazano również niewielkie obniżenie aktywności LPL w surowicy (Packard i wsp.1993, Wiseman i wsp.1993). Przy nadmiarze hormonu tarczycy niektórzy autorzy stwierdzali obniżenie (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, Lithell i wsp. 1981), a inni podwyższenie (Wilson i wsp. 1977) aktywności enzymu w mięśniach szkieletowych. Podobnie niejednoznaczne wyniki uzyskano analizując wpływ stanu



Rycina 2.

Schemat przedstawiający wpływ stanu czynnościowego tarczycy na metabolizm kwasów tłuszczowych i cholesterolu: β -oksydacja, synteza kwasów tłuszczowych 18:0, acetoocetanu, 7α -hydroksy-cholesterolu:

* modyfikowane przez hormon tarczycy

FA kwas tłuszczowy

(A) syntetaza acylokoenzymu A; +CoA

(B) hydrolaza acylokoenzymu A; - CoA

(C) β -oksydacja

(D) karboksylaza acetylokoenzymu A; +CO₂

(E) syntetaza kwasów tłuszczowych; -CO₂

(F) wydłużanie łańcucha kwasu tłuszczowego; +NAD(P)H

(G) tiolaza; +acetyl-CoA, -CoA

(H) syntetaza HMG-CoA; +acetyl-CoA, -CoA

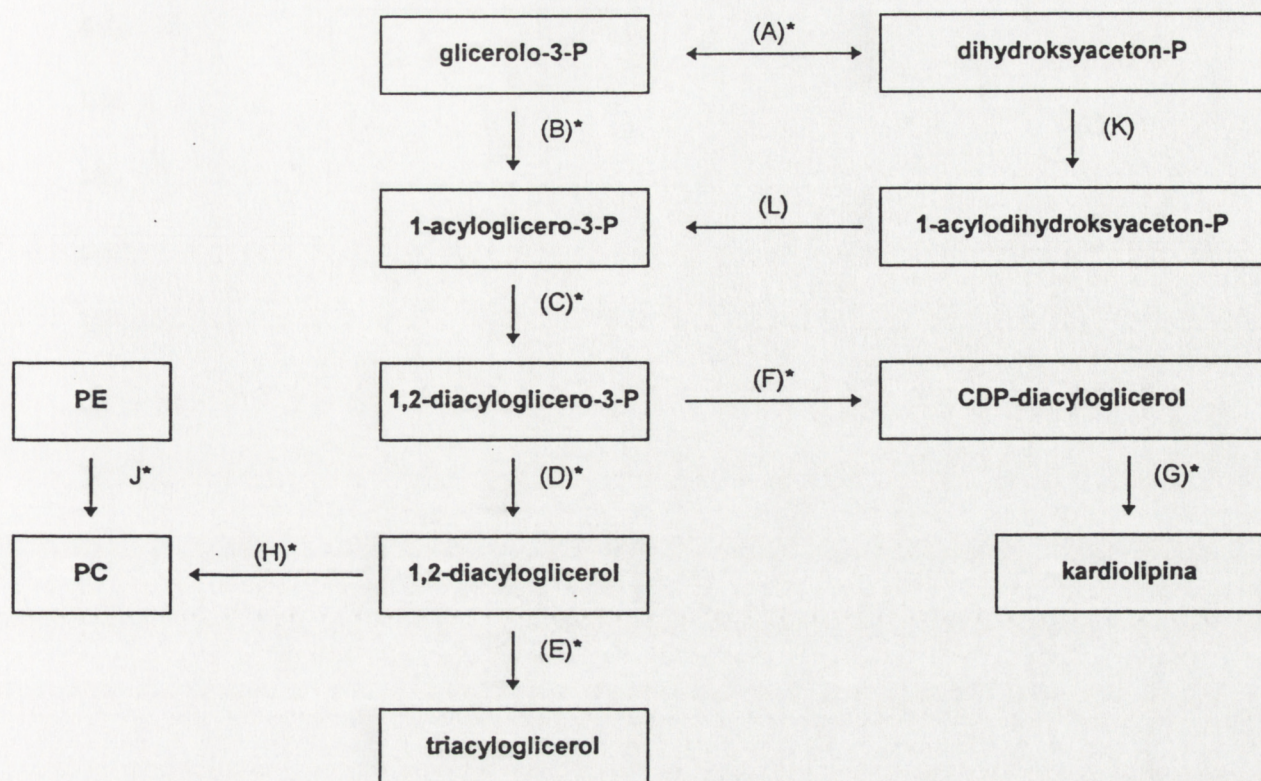
(I) ligaza HMG-CoA; +acetyl-CoA

(J) reduktaza HMG-CoA; +2NADPH, -2NADP⁺, -CoA, równoległa synteza cholesterolu

(K) acylo-CoA: acylotransferaza cholesterolowa; +acyl-CoA, esteraza cholesterolowa, -FA

(L) hydroksylaza 7α -cholesterolowa; +NADPH, +O₂, -NADP⁺

Rycina wg Hoch, 1988



Rycina 3.

Wpływ stanu czynnościowego tarczycy na niektóre etapy szlaku przemiany glicerolo-3-fosforanu w triacyloglicerole i fosfoglicerole.

P - fosforan,

* modyfikowane przez stan czynnościowy tarczycy, pozostałe etapy szlaku nie były sprawdzane

(A) dehydrogenaza glicerolo-3-fosforanowa; +NAD(H) lub FAD(H₂)

(B) acylokoenzym A; acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa; + acyl-CoA, - CoA

(C) acylotransferaza 1-acyloglicero-3-fosforanowa; + acyl-CoA, - CoA

(D) fosfohydrolaza fosfatydianowa; +H₂O, -P_i

(E) acylotransferaza diacyloglicerolowa; + acyl-CoA, - CoA

(F) cytydylotransferaza CTP-fosfatydianowa; +CTP, - PP_i

(G) obejmuje: syntetazę fosfatydyloglicerofosforanową (+glicerolo-3fosforan, -CMP), fosfohydrolazę fosfatydyloglicerofosforanową (+H₂O, -P_i) i CDP-digliceryd:fosfatydylotransferazę fosfatydyloglicerolową (+CDP-diacyloglicerol, -CMP)

(H) szlak CDP-cholinowy syntezy PC obejmujący kinazę cholinową fosfocholino-cytydylo transferazę fosfocholino-diacyloglicerolo transferazę; +ATP, +CTP, -ADP, -PP_i, -CMP

(J) szlak transmetylacji syntezy PC obejmujący metylotransferazę; + S-adenozylometionina, -S-adenozylhomocysteina

Aktywność fosfolipazy A (nie pokazane na rysunku) może prowadzić do powstania FFA w przemianach B i C
Rycina wg Hoch 1988

czynnościowego tarczycy na aktywność lipazy lipoproteinowej w mięśniu sercowym. I tak u zwierząt z niedoborem trijodotyroniny stwierdzono znaczny wzrost aktywności zewnątrzkomórkowej LPL (Ong i wsp. 1994) w myocardium, brak zmian aktywności całkowitej LPL (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980) lub jej obniżenie (Mallov i Alousi 1967). W doświadczalnie wywołanej hipertyreozie opisywano wzrost lub brak zmian w aktywności LPL w sercu szczurów (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, Alousi i Mallov 1964, Wilson i wsp. 1977).

3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Trijodotyronina w znacznym stopniu modyfikuje metabolizm lipidów, jednakże mechanizm leżący u podstaw tego działania jest wciąż jeszcze niedostatecznie poznany. Szczególnie mało jest danych dotyczących wpływu nadmiaru lub niedoboru T_3 na aktywność lipazy lipoproteinowej hydrolizującej TG osocza, wielkość wewnątrzkomórkowych (zwłaszcza mięśniowych) zasobów triacylogliceroli (TG), oraz udział wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) pochodzących z hydrolizy TG osocza w zwiększonym podczas pracy mięśniowej tempie metabolizmu energetycznego ustroju.

Celem obecnej pracy było więc zbadanie wpływu doświadczalnie wywołanej hipo- lub hipertyreozы na aktywność dwóch form lipazy lipoproteinowej w mięśniu płaszczkowatym i sercowym szczura oraz wpływu poziomu krążącej we krwi trijodotyroniny na stężenie TG osocza oraz zawartość wewnątrzmięśniowych TG.

Znaczenie TG osocza jako źródła WKT dla metabolizmu mięśniowego wydaje się tym istotniejsze im wyższe jest tempo ogólnego ich obrotu metabolicznego. Podjęto więc próbę określenia tempa zaniku [^{14}C]-chylomikronów z krwi i wychwytu kwasów tłuszczowych pochodzących z TG osocza przez mięsień płaszczkowaty i sercowy szczurów z doświadczalnie wywołaną niedoczynnością i nadczynnością tarczycy.

Ze względu na znaczny udział lipidów jako substratu energetycznego podczas pracy mięśniowej, za celowe uznano także zbadanie wpływu jednorazowego i powtarzanego wysiłku fizycznego na aktywność dwóch form LPL (zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej) w mięśniu płaszczkowatym i sercowym oraz niektóre wskaźniki metabolizmu lipidów u szczurów z niedoborem lub nadmiarem trijodotyroniny.

4. MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta

Badania przeprowadzono na szczurach samcach szczepu Wistar pochodzących z jednej hodowli. Zwierzęta używane do doświadczeń trzymano w grupach po 10 w drucianych klatkach o wymiarach 0,43 x 0,33 x 0,25 m w zwierzętarni, w stałej temperaturze $24^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ i 12 godzinnym cyklu światło-ciemność. Otrzymywały one standardową granulowaną mieszankę paszową (produkcji Zakładów Doświadczalnych Wytwórni Pasz w Motyczu) oraz wodę *ad libitum*. Szczury pozbawiano pokarmu na 16-18 godzin przed doświadczeniem, pozostawiając im jednak swobodny dostęp do wody.

Program doświadczeń został zatwierdzony przez Komisję Nadzoru nad Dokonywaniem Badań na Ludziach i Zwierzętach przy I-CMDiK PAN.

Przebieg doświadczeń

Szczury podzielono na następujące grupy doświadczalne:

- zwierzęta o normalnej czynności tarczycy, kontrolne, **K** (masa ciała 210-230 g)
- zwierzęta, którym usunięto tarczycę w czwartym tygodniu życia a następnie podawano przez 4-5 tygodni PTU (6-n-Propyl-2-Thiouracyl) w 0.04% roztworze wodnym, **THY+PTU** (masa ciała 150-180 g)
- zwierzęta, którym przez trzy dni podawano trijodotyroninę (T_3 , Glaxo Laboratories LTD) w podskórnych iniekcjach w dawce $75\mu\text{g}/100\text{ g}$ masy ciała, **T3** (masa ciała 170-190 g)

Szczury z każdej z trzech grup podzielono następnie na podgrupy:

- zwierzęta o normalnej aktywności ruchowej (**S**)
- zwierzęta poddane jednorazowemu wysiłkowi fizycznemu (**W**)
- zwierzęta poddane treningowi wytrzymałościowemu (**T**)

Zwierzęta z podgrupy W wykonywały jednorazowy 30 min. wysiłek wytrzymałościowy o umiarkowanej intensywności (prędkość biegu = $20\text{ m} \times \text{min}^{-1}$, kąt nachylenia bieżni = 0°) na bieżni taśmowej (typ KT-10-02, produkcji centralnego Ośrodka Techniki Medycznej w Białymstoku). Obciążenie przy takim wysiłku określa się na ok. 50% maksymalnego pobierania tlenu ($\text{VO}_2 \text{ max.}$) (Bedford i wsp. 1979, Sonne i Galbo, 1980).

Szczury z podgrupy T poddano pięcioletniemu treningowi wytrzymałościowemu. Cykl treningowy rozpoczynano gdy masa ciała zwierząt wynosiła 80-90g (u szczurów z usuniętą tarczycą było to po upływie jednego tygodnia od tyroidektomii). Trening polegał na stosowaniu codziennych, ok. godzinnych wysiłków o umiarkowanej intensywności na elektrycznej bieżni taśmowej 5 razy w tygodniu przez 5 tygodni. W pierwszym tygodniu treningu prędkość biegu wynosiła $16\text{ m} \times \text{min}^{-1}$, a kąt nachylenia bieżni 0° . Prędkość biegu zwiększano co tydzień o $4\text{ m} \times \text{min}^{-1}$, aż do osiągnięcia szybkości $28\text{ m} \times \text{min}^{-1}$ w czwartym i piątym tygodniu procesu treningowego.

Przeprowadzono dwie podstawowe serie doświadczeń.

Celem pierwszej serii badań było określenie aktywności dwóch form LPL w mięśniach płaszczkowatym i sercowym, stężenia TG w surowicy krwi i mięśniach oraz poziomu WKT w surowicy u zwierząt wszystkich trzech grup (K, THY+PTU, T3) w spoczynku, po jednorazowym wysiłku i po treningu. Materiał do badań (krew i tkanki) pobierano o godz. 9-11 rano natychmiast po dekapitacji. Szczury wykonujące jednorazowe wysiłki fizyczne dekapitowano natychmiast po zakończeniu wysiłku, natomiast zwierzęta poddane procesowi treningowemu w 24 godz. po ostatnim wysiłku. Krew z tętnic szyjnych pobierano natychmiast po dekapitacji a następnie izolowano mięsień płaszczkowaty łydki oraz mięsień sercowy (koniuszek). Wyizolowane mięśnie płukano w $0,15\text{ M NaCl}$ i zamrażano w ciekłym azocie (-70° C), natomiast krew

odwirowywano w temperaturze 4° C. Otrzymaną surowicę krwi oraz próbki mięśni przechowywano w stanie zamrożonym do czasu wykonania analiz, nie dłużej jednak niż 2-3 tygodnie.

Drugą serię doświadczeń przeprowadzono w celu określenia wpływu hormonów tarczycy na tempo zaniku znakowanych [¹⁴C]-chylomikronów z krwiobiegu oraz wychwyty kwasów tłuszczowych pochodzących z TG-chylomikronów osocza przez mięsień płaszczkowy łydki oraz mięsień sercowy. Badania tej serii przeprowadzono u szczurów wszystkich trzech grup doświadczalnych w spoczynku a ponadto u zwierząt kontrolnych (K) i u szczurów z doświadczalnie wywołaną niedoczynnością tarczycy (THY+PTU) po zakończeniu treningu. U zwierząt w narkozie pentobarbitalowej (50 mg/kg m.c.) izolowano żyłę szyjną do której podawano mieszaninę znakowanych chylomikronów oraz albuminę znakowaną [¹³¹I]. Krew pobierano z żyły ogonowej przed oraz po 1, 3, 5, 7 i 10 min od podania znakowanych chylomikronów a następnie izolowano mięsień płaszczkowy oraz serce. Określono okres półtrwania znakowanych chylomikronów w krwi oraz radioaktywność w badanych mięśniach.

Oznaczanie hormonów tarczycy

Stężenie całkowitej tyroksyny (T₄) oraz trijodotyroniny (T₃) oznaczono w surowicy krwi metodą radioimmunologiczną przy użyciu testów RIA-T₄ i RIA-T₃ produkowanych przez Instytut Badań Jądrowych w Świerku. Metoda ta oparta jest na reakcji hormonu ze swoistym przeciwciałem, a następnie oddzieleniu hormonu związanego od niezwiązanego przy użyciu glikolu polietylenowego (PGE). Stosowany do oznaczeń bufor zawierał kwas anilinonaftalenosulfonowy (ANS) celem zablokowania endogennych białek wiążących T₄ i T₃.

Oznaczanie wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy

Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) w surowicy krwi (20 μ l) oznaczano spektrofotometrycznie enzymatyczną mikrometodą opisaną przez Shimizu i wsp. (1979), której zasada oparta jest na aktywacji WKT w cyklu sprzężonych reakcji enzymatycznych zapoczątkowanych przez bakteryjną syntetazę acylo-CoA w obecności ATP i CoA.

Oznaczanie triacylogliceroli w surowicy krwi i mięśniach

Triacyloglicerole (TG) w surowicy krwi oznaczano metodą enzymatyczną po uprzedniej saponifikacji etanolowym roztworem KOH (ok. 0,5 N) wg metody Eggsteina i wsp. (1973) przy użyciu testów Boehringer (Mannheim, Niemcy).

Wewnątrzmięśniowe TG oznaczono według tej samej metody po ekstrakcji lipidów z tkanek mieszaniną Folcha (chloroform : metanol, 2:1, v/v) (1957). W tym celu próbki mięśni o masie 40-50 mg, pozbawione widocznych śladów tkanki łącznej i tłuszczowej umieszczano w mieszaninie ekstrakcyjnej (w stosunku 1:20 czyli na 1g tkanki 20 ml mieszaniny) i pozostawiano na 24 godz. w szczelnie zakorkowanych probówkach szklanych. Następnie odciągano górną warstwę, usuwano mięsień a dolną warstwę, chloroformową, odparowywano do sucha po uprzednim przemyciu małą objętością roztworu do przemywań (chloroform: metanol: woda, 3:48:47). Uzyskaną w ten sposób próbkę lipidów wewnątrzmięśniowych zmydlano w 1,5 ml roztworu KOH : C₂H₅OH w temperaturze 70°C przez 30 min. Po schłodzeniu do temperatury 24°C dodawano dla zobojętnienia 2 ml MgSO₄ (0,15 M), dokładnie mieszano i odwirowywano przez 10 min. przy szybkości 3000 rpm. Stężenie TG oznaczano w nadsączu. W celu wyeliminowania fosfolipidów i WKT z ekstraktu stosowano aktywowany kwas krzemowy.

Oznaczanie aktywności lipazy lipoproteinowej (LPL) w próbkach mięśni

Aktywność LPL (EC 3.1.1.3) określano wg metody Taskinen i wsp. (1980) we własnej modyfikacji umożliwiającej pomiar aktywności formy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej enzymu. Mierzono uwalnianie [^{14}C] kwasu oleinowego z substratu tzn. emulsji glicero-tri- ^{14}C] oleinianu stabilizowanego gumą arabską w roztworze buforowym zawierającym albuminę i surowicę ludzką, stanowiącą źródło aktywatora enzymu. Aktywność LPL wyrażono w μmol ach WKT uwolnionych przez 1 g tkanki w ciągu 1 godz.

Przygotowanie substratu

Mieszaninę 50 μl glicero-tri- ^{14}C] oleinianu (5 μCi) i 100 mg zimnego trioleinianu (ok. 110 μl) w 5 ml benzenu odparowywano do sucha, następnie dodawano 7,5 ml 5% roztworu gumy arabskiej w 0,2 M buforze TRIS-HCl, pH 8,6 i sonifikowano przez 4 min. przy użyciu dezintegratora ultradźwiękowego UD 11 (Techpan). Ostateczny substrat uzyskiwano poprzez wymieszanie 7,5 ml emulsji znakowanego trioleinianu w roztworze gumy arabskiej, 7,5 ml 5% albuminy (BSA, wolnej od kwasów tłuszczowych) w 0,2 M buforze TRIS-HCl, pH 8,6 oraz 3,75 ml surowicy ludzkiej (Taskinen i wsp. 1980). Tak przygotowany roztwór zawierał 3,2 mmol/l trioleinianu.

Oznaczanie aktywności formy zewnątrzkomórkowej LPL

Aktywność formy zewnątrzkomórkowej, naczyniowej LPL, często określanej jako LPL uwalniana przez heparynę, oznaczono w eluatach heparynowych tkanki mięśniowej. W tym celu skrawki mięśni o masie 3-10 mg inkubowano w 200 μl buforu Krebs-Ringer-0,1 M HCl o pH 8,4 zawierającego 2,5 jednostek (IU) heparyny w temperaturze 28°C przez 40 min. Następnie usuwano skrawki mięśni, a do eluatu dodawano 500 μl substratu i prowadzono dalszą inkubację przez 120 min. Po tym czasie

z mieszaniny inkubacyjnej pobierano 300 μ l próbkę (w dwóch powtórzeniach) i zatrzymywano reakcję przez dodanie 3,25 ml mieszaniny metanolu : chloroformu : heptanu (1,41:1,25:1,00, v/v/v), a następnie 1,05 ml buforu boranowego, pH 10,5 (Belfrage i Vaughan 1969). Rozdział faz uzyskiwano przez odwirowanie z prędkością 2500 rpm. Z górnej fazy zawierającej WKT pobierano 1ml, dodawano mieszaninę scyntylacyjną i mierzono radioaktywność w liczniku scyntylacyjnym LKB Wallac 1211. W każdej serii oznaczeń wykonywano pomiar aktywności próby ślepej (bez tkanki mięśniowej) oraz standardu LPL, którym było odtłuszczone świeże mleko krowie rozcieńczone wodą w stosunku 1 : 20.

Oznaczenie aktywności formy wewnątrzkomórkowej LPL

Aktywność wewnątrzkomórkowej formy LPL, określanej też jako rezydualna, heparyno-niezależna LPL, oznaczono w skrawkach mięśni, z których uprzednio wyeluowano heparyną formę naczyniową lipazy. Skrawki te homogenizowano w 500 μ l buforu Krebs-Ringer-0,1 M HCl, pH 8,4. Z otrzymanego homogenatu pobierano 200 μ l do oznaczeń, dodawano 500 μ l substratu i inkubowano przez 120 min. w temperaturze 28° C. Dalszy sposób postępowania był analogiczny jak dla formy naczyniowej LPL.

Oznaczanie zaniku 14 C-TG-chylomikronów z krwi i wychwytu uwolnionych WKT przez mięśnie

A. Otrzymywanie znakowanych 14 C-TG-chylomikronów

Chylomikrony otrzymywano od szczurów „dawców”o masie ciała 300-350 g, które przez ostatnie dwa dni przed operacją zamiast wody otrzymywały do picia 0,9% NaCl i były pozbawione pokarmu przez 16 godz. Na 1,5 godz. przed zabiegiem chirurgicznym zwierzętom podawano dożołądkową sondą 1 ml oleju sojowego. Podczas

operacji wykonywanej w narkozie pentobarbitalowej (50 mg/kg m.c.) izolowano, a następnie kaniulowano piersiowy przewód limfatyczny zgodnie z procedurą Bollmana i wsp. (1948). Ponadto kaniulowano żyłę biodrową, przez którą uzupełniano ubytek płynu w czasie zbierania limfy podając roztwór fizjologiczny (0,9% NaCl). Gdy z wyizolowanego przewodu limfatycznego limfa zaczynała sączyć się regularnie szczurom podawano dodwunastniczo 1 ml emulsji oleju sojowego zawierającej 200 μCi [$1\text{-}^{14}\text{C}$] palmitynianu w roztworze albuminy. Zbieranie limfy rozpoczynano wówczas gdy z przezroczystej stawała się biała i pojawiała się w niej radioaktywność. Limfę zbierano na EDTA przez 12-15 godz. (do zaniku radioaktywności). Uzyskane próbki łączono i odwirowywano przez 1 godz. z prędkością 50000 g w temperaturze 4° C. Po odwirowaniu zbierano chylomikrony zgromadzone w górnej warstwie i uzupełniano objętość do początkowej 50 mM fosforanem potasowym o pH 7,4, zawierającym 4% albuminę (Linder i wsp.1976). Jakość preparatu znakowanych chylomikronów określano stosując elektroforezę cienkowarstwową na żelu krzemowym. Około 90-95% całkowitej radioaktywności preparatu stanowiły acyloglicerole, w których było ok. 90 % triacylogliceroli. Określano także specyficzną aktywność chylomikronów. Uzyskane tą metodą znakowane chylomikrony zachowywały swoje właściwości przez okres ok. 2 tygodni w temperaturze 4°C.

B. Pomiar tempa zaniku chylomikronów z krwi i wychwytu uwolnionych WKT przez mięśnie

Od szczurów doświadczalnych w narkozie pentobarbituranowej (50 mg/kg m.c.) pobierano z żyły ogonowej krew do oznaczania stężenia początkowego TG oraz hematokrytu. Następnie izolowano i kaniulowano prawą żyłę szyjną do której podawano znakowane ^{14}C -chylomikrony (ok. 100 μl , tak aby ilość impulsów wynosiła ok. 300000

cpm/ml krwi) oraz albuminę znakowaną ^{131}J . Próbkę krwi (50 μl) pobierano z żyły ogonowej w czasie 1, 3, 5, 7 i 10 min. od podania znakowanych chylomikronów. Aby wyekstrahować całkowicie [^{14}C]-TG, a równocześnie związać wolne kwasy tłuszczowe z osocza, krew pobierano do 1ml alkoholu izopropylowego zawierającego niewielką ilość tlenku glinu. Tlenek glinu powoduje całkowitą adsorpcję kwasów tłuszczowych co uniemożliwia ich ekstrakcję do supernatantu. Próbkę krwi po dokładnym wymieszaniu odwirowywano przez 10 min. z prędkością 3000 rpm i w otrzymanym nadsącu określano radioaktywność w celu wyznaczenia tempa zaniku [^{14}C]-TG chylomikronów z krwi. W pozostałym osadzie mierzono radioaktywność [^{131}J]-albuminy, co wraz z oznaczonym hematokrytem pozwalało na określenie objętości osocza każdego szczura. Po pobraniu ostatniej próbki krwi zwierzęta dekapitowano i pobierano mięsień płaszczkowaty łydki z obydwu kończyn tylnych oraz mięsień sercowy (koniuszek). Mięśnie płukano w 0,15 M NaCl, suszono, pozbawiano widocznych śladów tkanki tłuszczowej, ważono i umieszczano w mieszaninie chloroform : metanol (2:1, v:v) w celu ekstrakcji lipidów. Po 24 godz. mięśnie wyjmowano z mieszaniny ekstrakcyjnej i mierzono w nich radioaktywność [^{131}J]-albuminy w celu wyznaczenia objętości krwi pozostałej w naczyniach włosowatych (w liczniku LKB Wallac RiaGamma), natomiast pozostały ekstrakt odparowywano do sucha, a następnie rozpuszczano w mieszaninie scyntylacyjnej (toluen-triton-PPO-POPOP) i mierzono radioaktywność ^{14}C w liczniku LKB Wallac 1211.

Wyliczenia:

1) Wychwył netto [^{14}C]-WKT przez mięsień

$$[^{14}\text{C}]\text{cpm g/min} - [^{131}\text{J}]\text{cpm g/min} \times ([^{14}\text{C}]\text{cpm/min/ml} : [^{131}\text{J}]\text{cpm/min/ml})$$

2) Okres półtrwania [^{14}C]-TG chylomikronów [min]

$t_{1/2} = \ln 2 : B$ gdzie B współczynnik regresji wyliczony dla zaniku [^{14}C] - TG
chylomikronów

3) Stała tempa obrotu triacylogliceroli osocza (K) [min^{-1}]

$$K = 0,693 : t_{1/2}$$

4) Obrót triacylogliceroli osocza (O_{TG}) [$\mu\text{mol}/\text{min}$]

$$O_{\text{TG}} = \text{TG}_p \times K \quad \text{gdzie } \text{TG}_p \text{ początkowa pula TG osocza} = [\text{TG}] \times P_{v_0};$$

P_{v_0} -objętość osocza

Statystyczne opracowanie wyników

W każdej serii doświadczalnej obliczano dla mierzonych wartości średnią arytmetyczną (\bar{x}) i błąd standardowy (\pm S.E.). Statystyczną istotność różnic między grupami oceniano testem t-Studenta dla zmiennych niesparowanych. Hipotezę zerową odrzucano przy $p < 0,05$.

5. WYNIKI

Stężenie hormonów tarczycy w surowicy krwi szczurów z doświadczalnie wywołanym niedoborem bądź nadmiarem tych hormonów

Stężenie tyroksyny (T_4) i jej odjodowanej pochodnej trijodotyroniny (T_3) w surowicy krwi zwierząt oznaczono w celu sprawdzenia czy zastosowane metody:

(1) operacyjnego usunięcia gruczołu tarczowego a następnie podawanie PTU przez 5 tygodni oraz (2) iniekcje T_3 przez trzy dni pozwalają uzyskać odpowiednio znaczne obniżenie (grupa THY+PTU) bądź podwyższenie (grupa T_3) krążących we krwi hormonów tarczycy.

U szczurów kontrolnych w spoczynku stężenie T_4 wynosiło $46,5 \pm 2,7$ ng x ml⁻¹, a T_3 $0,52 \pm 0,02$ ng x ml⁻¹ (Tab. 1). U szczurów z grupy THY+PTU zarówno stężenie we krwi T_4 jak i T_3 było istotnie obniżone i wynosiło odpowiednio $9,8 \pm 1,3$ i $0,35 \pm 0,02$ ng x ml⁻¹, co stanowi ok. 21% i 67% wartości uzyskanych u szczurów w stanie eutyreozy. W grupie T_3 stężenie tyroksyny nie zmieniło się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną, natomiast stężenie krążącej trijodotyroniny było znacznie podwyższone (300% vs K) i wynosiło $15,39 \pm 1,36$ ng x ml⁻¹.

Stężenie WKT i TG w surowicy szczurów z niedoborem i nadmiarem T_4 i T_3

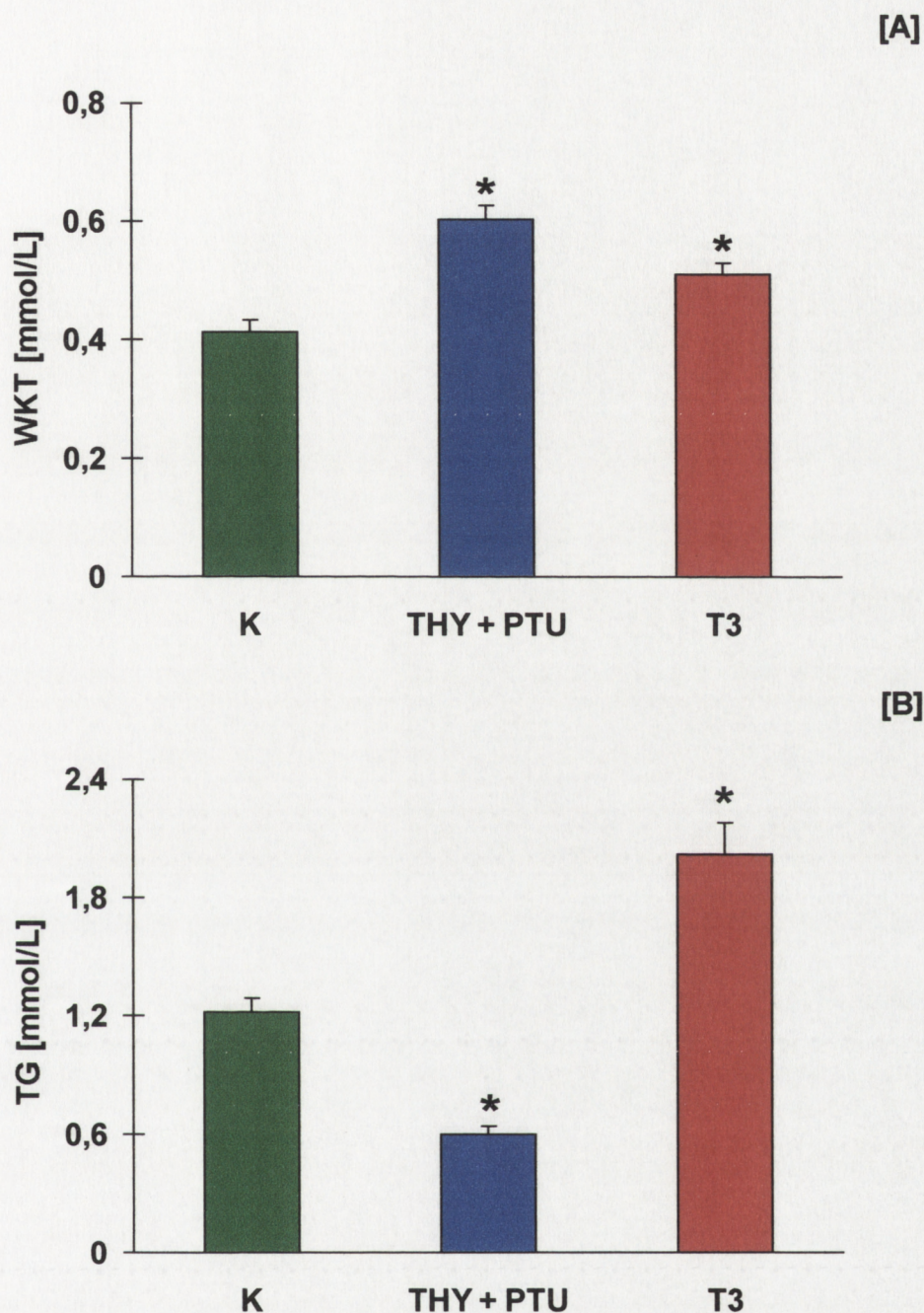
W spoczynku stężenie WKT w surowicy krwi było istotnie wyższe od wartości kontrolnych zarówno u zwierząt z obniżonym jak i podwyższonym poziomem hormonów tarczycy we krwi (Ryc.4) i wynosiło odpowiednio $0,415 \pm 0,018$, $0,602 \pm 0,026$ i $0,509 \pm 0,022$ mmol x l⁻¹. Po jednorazowym 30 min. biegu na bieżni stężenie WKT u zwierząt kontrolnych istotnie wzrosło ($p < 0,01$), natomiast u pozostałych grup zwierząt nie zmieniło się istotnie a nawet obserwowano tendencję do obniżania się (Ryc.5). Po treningu wytrzymałościowym stężenie WKT w surowicy było zbliżone u

Tabela 1

Stężenie tyroksyny (T₄) i trijodotyroniny (T₃) w surowicy krwi szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY + PTU) oraz z ich nadmiarem (T3) w warunkach normalnej aktywności ruchowej.

Hormon	Grupa		
	K	THY + PTU	T3
T ₄ [ng/ml]	46,5 ± 2,7 (n=15)	9,8 ± 1,3* (n=18)	53,1 ± 3,9 (n=19)
T ₃ [ng/ml]	0,52 ± 0,02 (n=17)	0,35 ± 0,02* (n=38)	15,39 ± 1,36* (n=10)

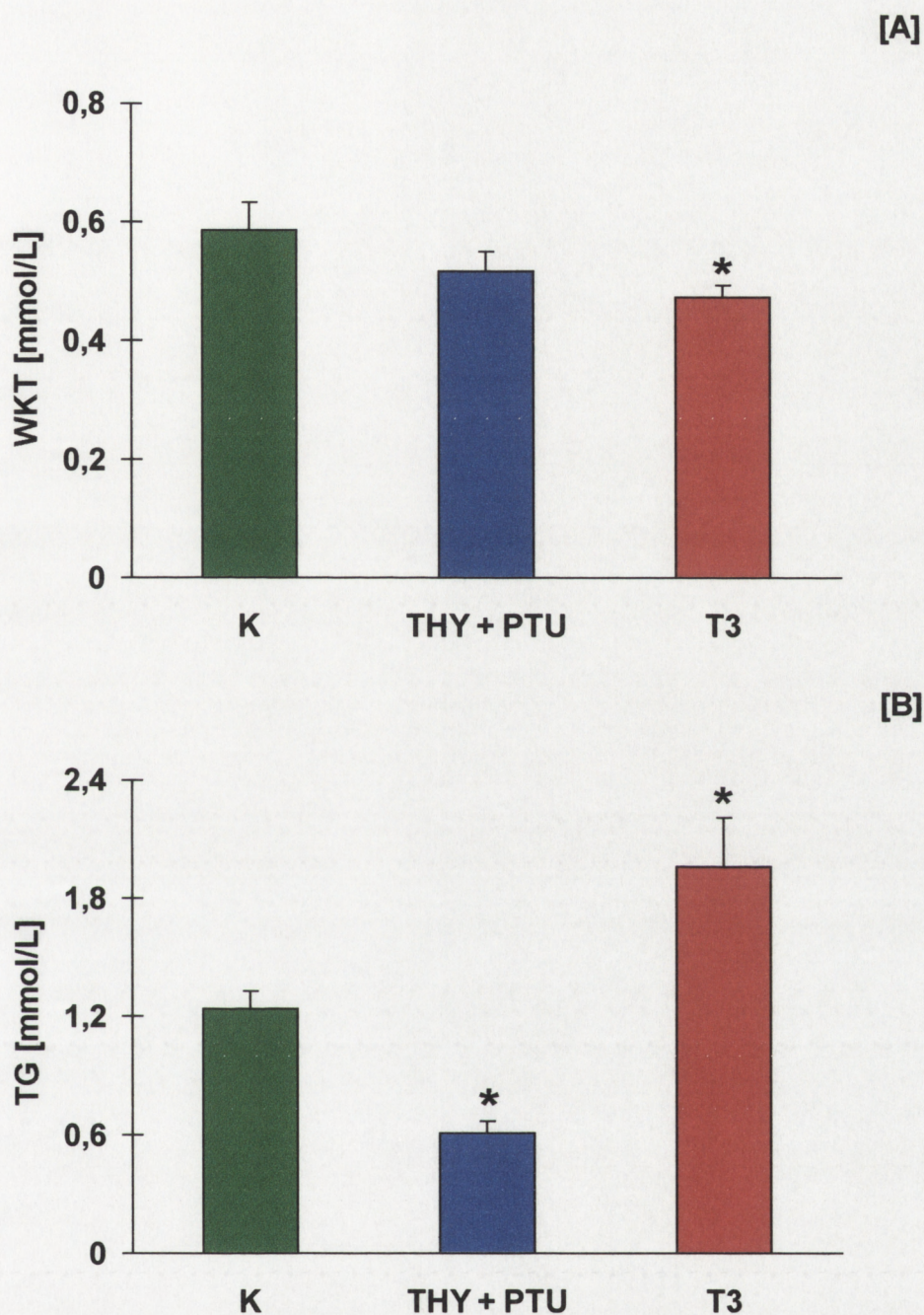
Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz w nawiasach liczbę zwierząt. Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt kontrolnych oraz u zwierząt z niedoborem i nadmiarem hormonów tarczycy.



Ryc. 4

Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) [A] i triacylogliceroli (TG) [B] w surowicy krwi szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) w warunkach normalnej aktywności ruchowej.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.



Ryc. 5

Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) [A] i triacylogliceroli (TG) [B] w surowicy krwi szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) po jednorazowym wysiłku.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.

zwierząt wszystkich badanych grup i mieściło się w zakresie 0,459 - 0,490 mmol x l⁻¹ (Ryc.6).

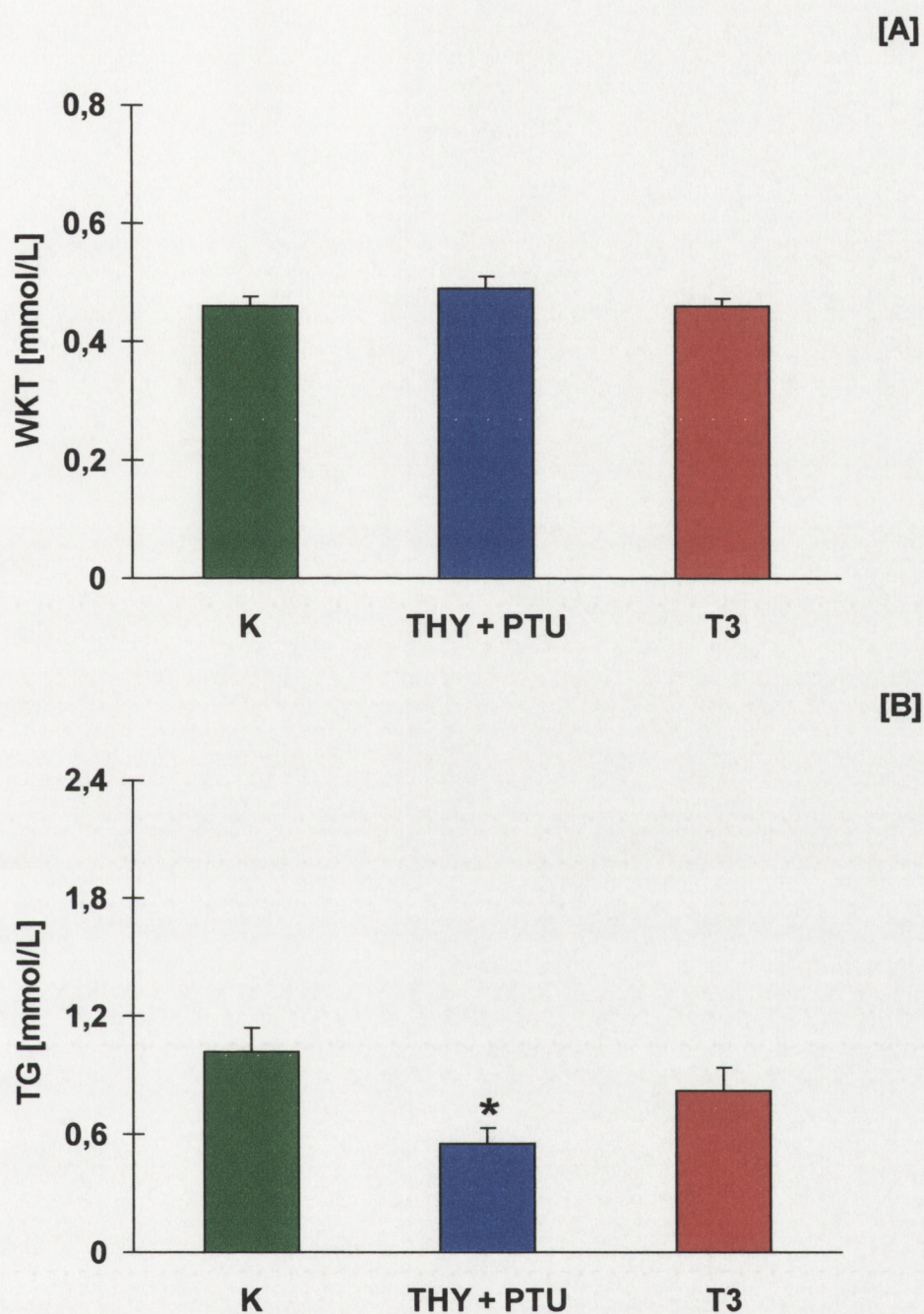
Stężenie triacylogliceroli (TG) w surowicy różniło się istotnie między badanymi grupami. U szczurów kontrolnych wynosiło ono w spoczynku 1,22±0,07 mmol x l⁻¹, u zwierząt z grupy THY+PTU 0,60±0,04 mmol x l⁻¹ (p <0,001), natomiast po trzydniowym podawaniu T₃ wzrosło do 2,02±0,16 mmol x l⁻¹ (p<0,001) (Ryc.4). Zastosowane wysiłki zarówno pojedyncze jak i powtarzane nie wpłynęły znacząco na stężenie TG u zwierząt z grup K i THY+PTU (Ryc.5-6). Jedynie w grupie T₃ stwierdzono pod wpływem treningu obniżenie stężenia TG do 0,82±0,12 mmol x l⁻¹ (p<0,001).

Aktywność dwóch form LPL w mięśni płaszczkowatym i sercowym szczurów z niedoborem i nadmiarem T₃ i T₄

We wstępnych doświadczeniach sprawdzono, że mierzona w mięśni płaszczkowatym i sercowym lipaza wykazuje właściwości lipazy lipoproteinowej, tzn wymaga obecności surowicy jako aktywatora, aktywowana jest przez heparynę o niskim stężeniu w środowisku alkalicznym (pH 8,4) a jej aktywność ulega zahamowaniu przy wysokim stężeniu NaCl (1M).

Stwierdzono, że powyższe właściwości charakteryzują zarówno formę naczyniową enzymu, uwalnianą heparyną i uważaną za zewnętrzną, aktywną formę LPL (Z-LPL), jak i formę wewnątrzkomórkową (W-LPL), pełniącą najprawdopodobniej rolę proenzymu oraz magazynu wewnątrzkomórkowego.

Sprawdzono również, że suma aktywności dwóch form LPL mierzonych oddzielnie jest zbliżona do wartości aktywności całkowitej LPL w badanych mięśniach oznaczonej tą samą metodą.



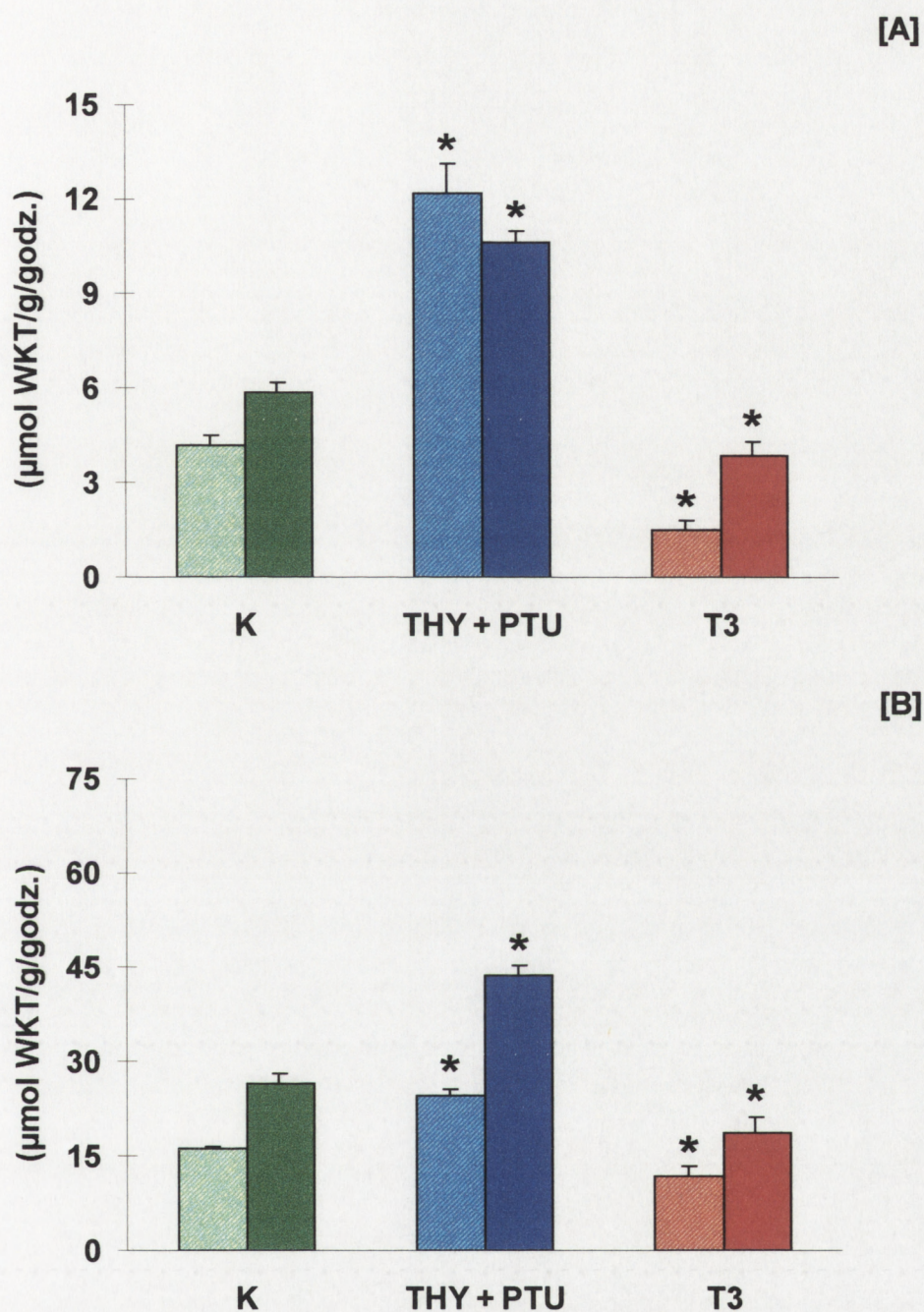
Ryc. 6

Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) [A] i triacylogliceroli (TG) [B] w surowicy krwi szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) po treningu.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.

Aktywność LPL w mięśniu płaszczkowatym szczurów kontrolnych w spoczynku wynosiła $4,2 \pm 0,3 \mu\text{mol WKT} \times \text{g}^{-1} \times \text{godz}^{-1}$ w przypadku formy zewnątrzkomórkowej i $5,9 \pm 0,3 \mu\text{mol WKT} \times \text{g}^{-1} \times \text{godz}^{-1}$ dla formy wewnątrzkomórkowej enzymu (Ryc.7). W warunkach obniżonego stężenia hormonów tarczycy po tyreodektomii i podawaniu PTU, aktywność formy Z-LPL wzrastała prawie trzykrotnie, natomiast aktywność formy wewnątrzkomórkowej, rezydualnej dwukrotnie ($p < 0,001$) w stosunku do odpowiednich wartości stwierdzonych w grupie kontrolnej. Podwyższenie stężenia krążącej w krwi trijodotyroniny spowodowało obniżenie aktywności lipazy lipoproteinowej mięśnia płaszczkowatego u zwierząt w spoczynku do wartości $1,5 \pm 0,3 \mu\text{mol WKT} \times \text{g}^{-1} \times \text{godz}^{-1}$ dla formy zewnątrzkomórkowej i do $3,9 \pm 0,4 \mu\text{mol WKT} \times \text{g}^{-1} \times \text{godz}^{-1}$ dla formy wewnątrzkomórkowej enzymu ($p < 0,001$). Jednorazowy 30 min. wysiłek na bieżni nie wpłynął na aktywność żadnej z form LPL w mięśniu płaszczkowatym pobranym od szczurów z grupy kontrolnej, natomiast u zwierząt z grupy THY+PTU zanotowano obniżenie aktywności formy zewnątrzkomórkowej enzymu ($p < 0,05$) a w grupie T3 formy wewnątrzkomórkowej LPL ($p < 0,01$) (Ryc.8). Po pięcioletnim treningu fizycznym u zwierząt z grup kontrolnej (K) i THY+PTU aktywność obydwu form LPL znacznie wzrosła ($p < 0,001$) w porównaniu z odpowiednimi wartościami uzyskanymi u zwierząt nie poddanych treningowi (Ryc.9). W grupie T3, w której szczury otrzymywały trijodotyroninę jedynie przez ostatnie trzy dni treningu zaobserwowano tendencję do podwyższania aktywności formy zewnątrzkomórkowej LPL (NS), natomiast aktywność formy wewnątrzkomórkowej enzymu była istotnie obniżona ($p < 0,001$) w stosunku do wartości stwierdzonych u zwierząt nietrenowanych, u których stosowano przez 3 dni iniekcje T₃.

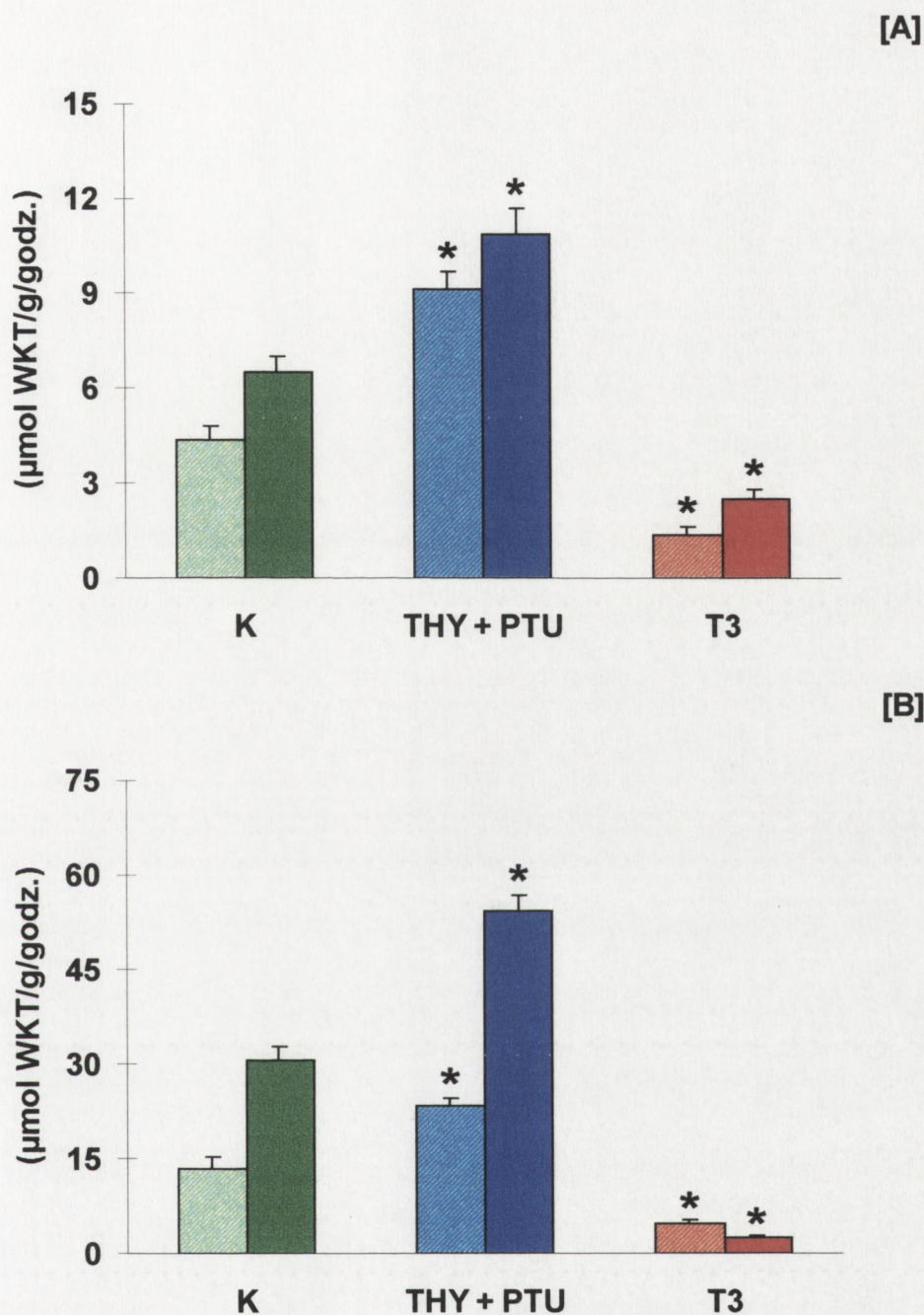
Aktywność lipazy lipoproteinowej w mięśniu sercowym była wielokrotnie wyższa niż w mięśniu płaszczkowatym. U zwierząt z grupy K w spoczynku wynosiła ona $16,1 \pm$



Ryc. 7

Aktywność formy naczyniowej (Z LPL; słupki prążkowane) i wewnątrzkomórkowej (W LPL; słupki pełne) lipazy lipoproteinowej w mięśniu płaszczkowatym [A] i sercowym [B] u szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) w warunkach normalnej aktywności ruchowej.

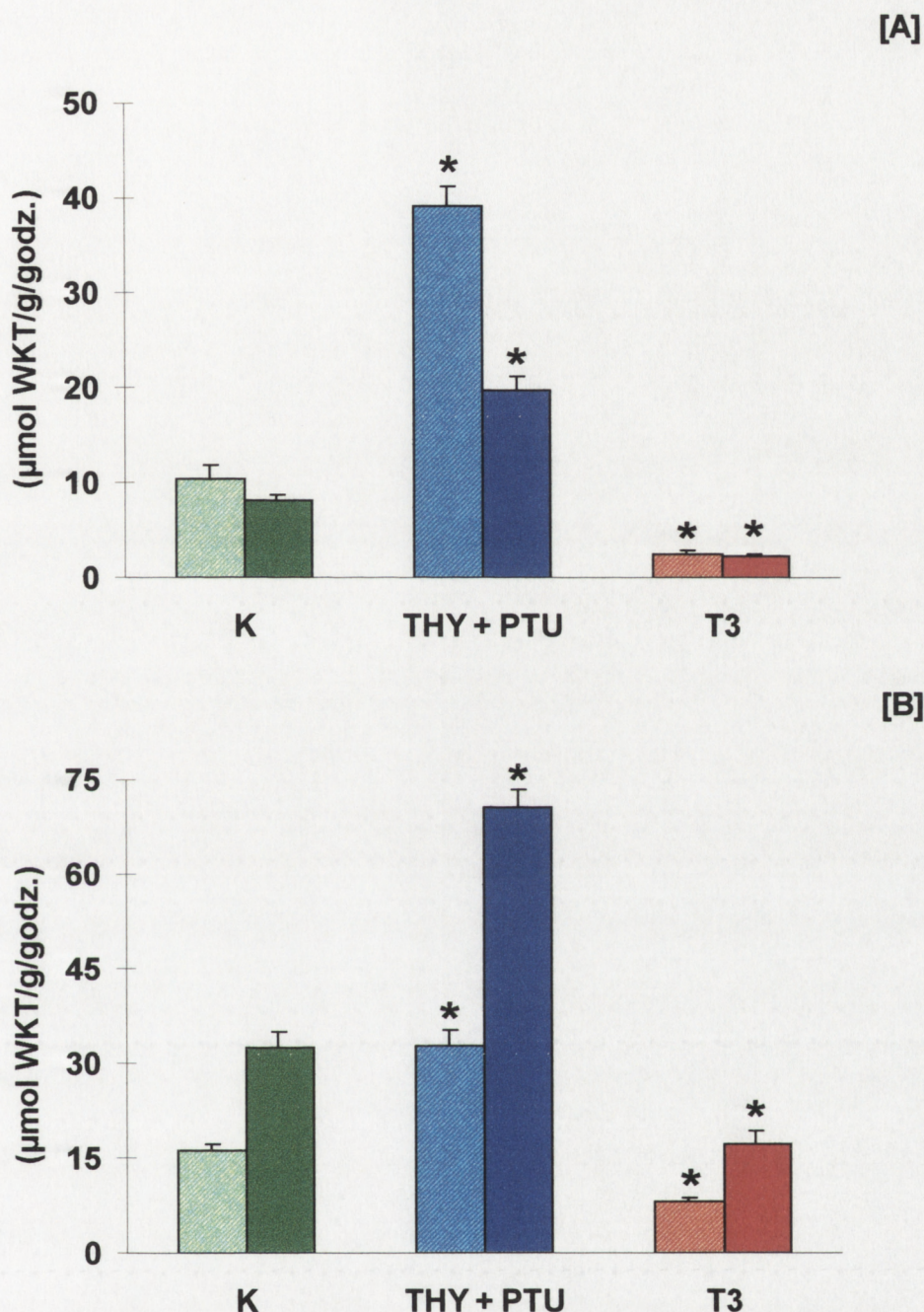
Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.



Ryc. 8

Aktywność formy naczyniowej (Z-LPL; słupki prążkowane) i wewnątrzkomórkowej (W-LPL; słupki pełne) lipazy lipoproteinowej w mięśniu płaszczkowatym [A] i sercowym [B] u szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) po jednorazowym wysiłku.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.



Ryc. 9

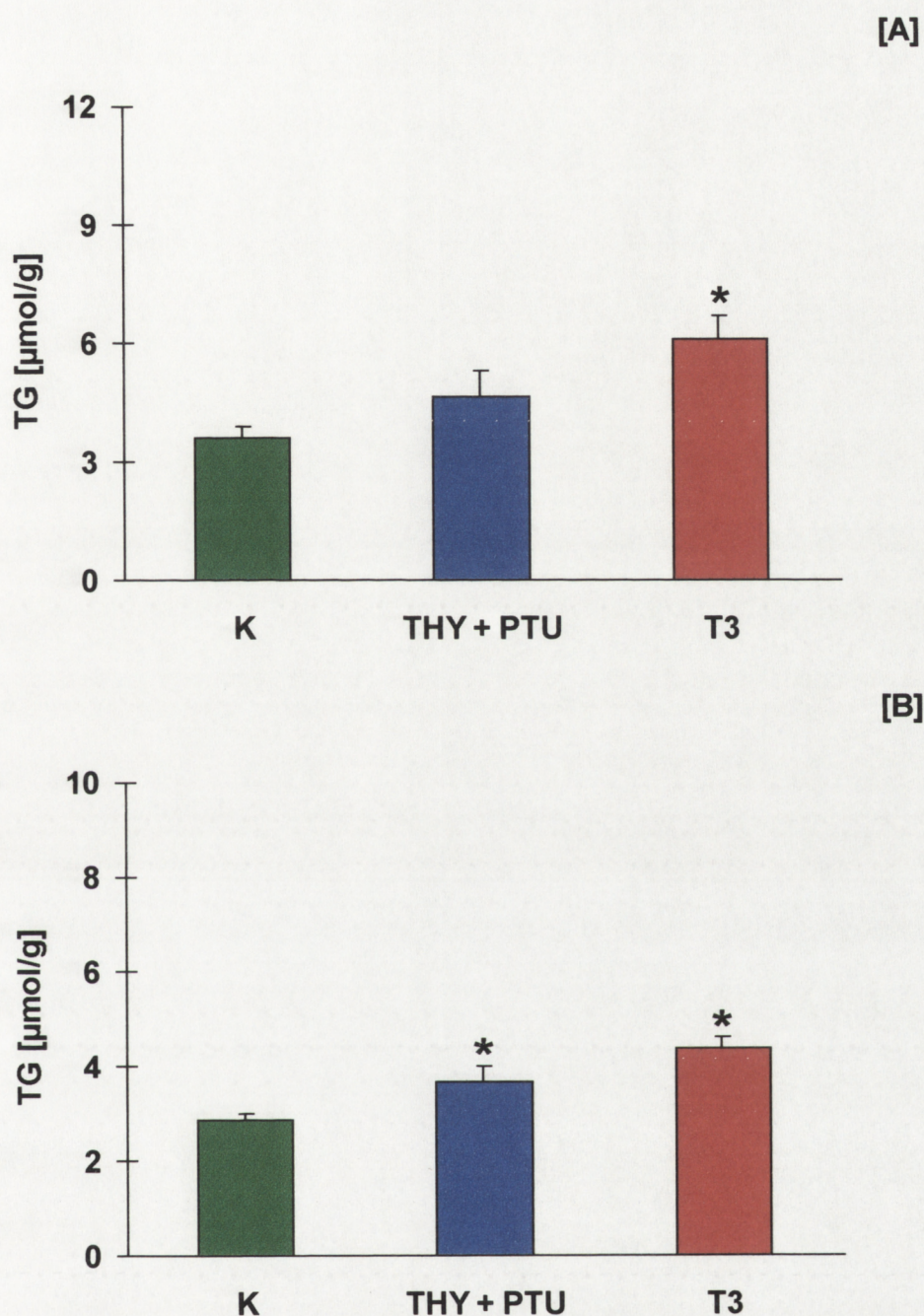
Aktywność formy naczyniowej (Z LPL; słupki prążkowane) i wewnątrzkomórkowej (W LPL; słupki pełne) lipazy lipoproteinowej w mięśniu płaszczkowatym [A] i sercowym [B] u szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) po treningu.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.

0,5 (forma Z-LPL) i $26,7 \pm 1,3$ (forma W-LPL) $\mu\text{mol WKT} \times \text{g}^{-1} \times \text{godz.}^{-1}$ (Ryc.7). U szczurów z grupy THY+PTU aktywność obydwu form LPL była istotnie wyższa i wynosiła odpowiednio $24,8 \pm 0,8$ i $43,6 \pm 1,8$ $\mu\text{mol WKT} \times \text{g}^{-1} \times \text{godz.}^{-1}$ ($P < 0,001$). U szczurów z grupy T3 aktywność enzymu była obniżona do $11,9 \pm 1,5$ (forma zewnątrzkomórkowa) i $18,8 \pm 2,3$ (forma wewnątrz-komórkowa) $\mu\text{mol WKT} \times \text{g}^{-1} \times \text{godz.}^{-1}$ ($p < 0,01$) w stosunku do odpowiednich wartości kontrolnych. Ani jednorazowy ani powtarzany wysiłek fizyczny nie wpłynęły w sposób istotny na aktywność formy zewnątrzkomórkowej LPL w mięśniu sercowym szczurów z grupy kontrolnej, natomiast stwierdzono u nich istotny ($p < 0,05$) wzrost aktywności formy wewnątrzkomórkowej po treningu (Ryc.8-9). W grupie zwierząt o obniżonym stężeniu hormonów tarczycy we krwi (THY+PTU) wykazano wzrost aktywności formy wewnątrzkomórkowej LPL po jednorazowym biegu na bieżni ($p < 0,01$) a po treningu wzrost aktywności obu form enzymu w porównaniu z podgrupą zwierząt o normalnej aktywności ruchowej ($p < 0,01$). U zwierząt z grupy T3 stwierdzono obniżenie aktywności obu form LPL w mięśniu sercowym pobranym natychmiast po jednorazowym biegu ($p < 0,01$). Po treningu wytrzymałościowym obniżeniu uległa tylko aktywność formy zewnątrz-komórkowej enzymu ($p < 0,05$).

Wewnątrzmięśniowe stężenie TG w warunkach niedoboru i nadmiaru hormonów tarczycy we krwi

Stężenie triacylogliceroli (TG) w mięśniu płaszczkowym szczurów w spoczynku wynosiło w grupie kontrolnej $3,58 \pm 0,34$ $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$, w grupie THY+PTU wykazywało tendencję do wyższych wartości ($4,66 \pm 0,63$ $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$, NS), zaś w grupie T3 osiągnęło wartość $6,09 \pm 0,60$ $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ ($p < 0,01$) (Ryc.10). U zwierząt z grup K i



Ryc. 10

Zawartość triacylogliceroli (TG) w mięśniu płaszczkowatym [A] i sercowym [B] szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) w warunkach normalnej aktywności ruchowej.

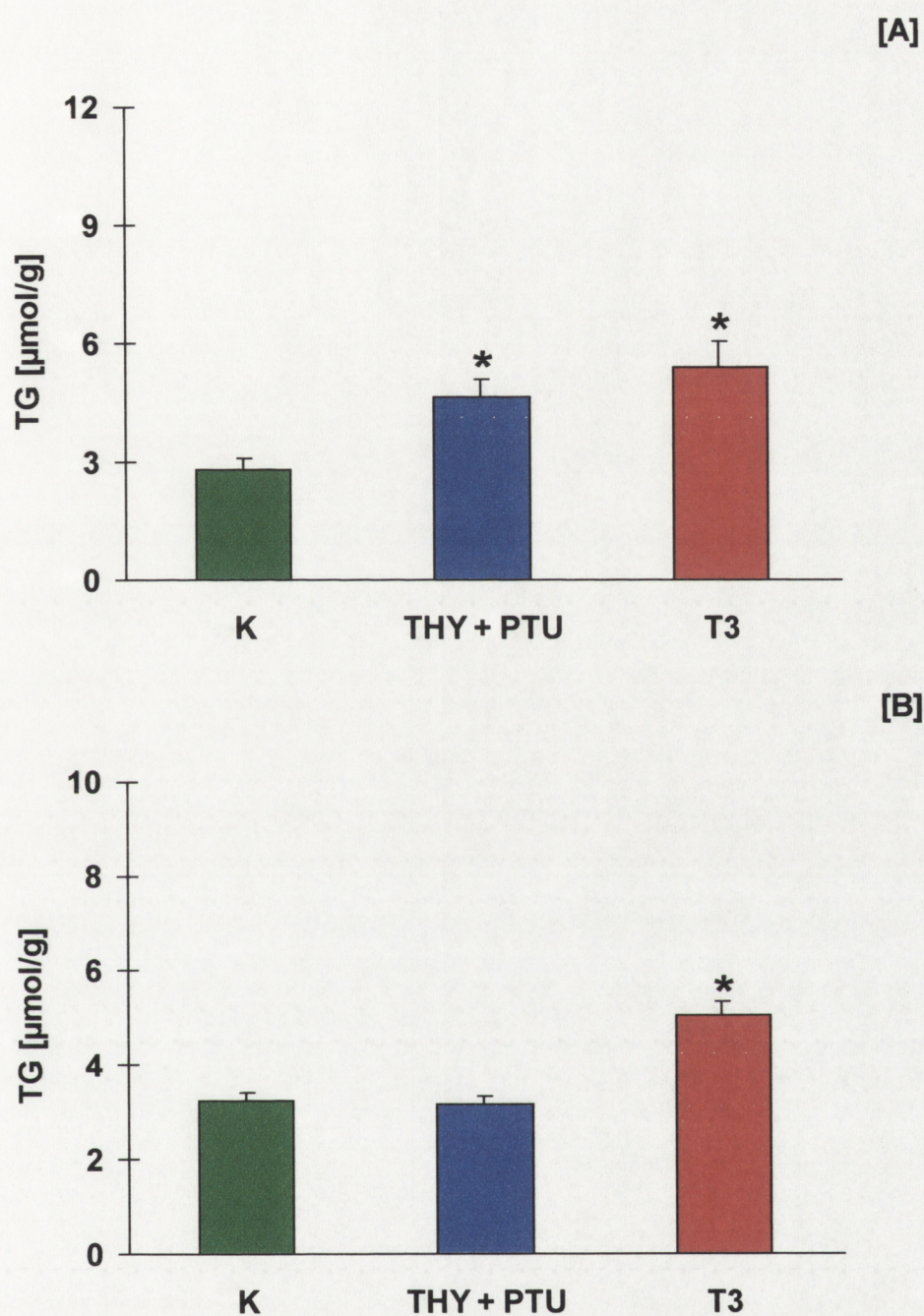
Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.

T3 stwierdzono obniżenie zawartości TG w mięśni płaszczkowatym po jednorazowym wysiłku (NS), natomiast po treningu wytrzymałościowym zasoby TG w tym mięśni znacznie wzrosły (K $p < 0,05$, T3 $p < 0,001$) (Ryc.11-12). U szczurów z grupy THY+PTU nie stwierdzono powysiłkowych zmian stężenia TG w mięśni płaszczkowatym.

Stężenie TG w mięśni sercowym, podobnie jak w mięśni płaszczkowatym było podwyższone u szczurów ze zmodyfikowanym stężeniem hormonów tarczycy (Ryc.10) i wynosiło u zwierząt kontrolnych $2,88 \pm 0,14 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$, w grupie THY+PTU $3,66 \pm 0,33 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$ a w grupie T3 $4,39 \pm 0,22 \mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$. Po jednorazowym 30 min. wysiłku zanotowano niewielki (NS) wzrost zawartości TG w mięśni sercowym zwierząt z grupy K i T3, natomiast po treningu wytrzymałościowym stężenie TG w sercu pobranym od tych zwierząt podwyższyło się odpowiednio o 76 i 89 % w porównaniu z wartościami osiąganymi w podgrupach o normalnej aktywności ruchowej ($p < 0,001$) (Ryc.11-12). Zastosowane wysiłki, zarówno jednorazowe jak i powtarzane, nie wpłynęły na stężenie TG w mięśni sercowym zwierząt grupy THY+PTU.

Wpływ hormonów tarczycy na tempo zaniku ^{14}C -TG-chylomikronów z krwi i wychwyty uwolnionych WKT przez mięśnie.

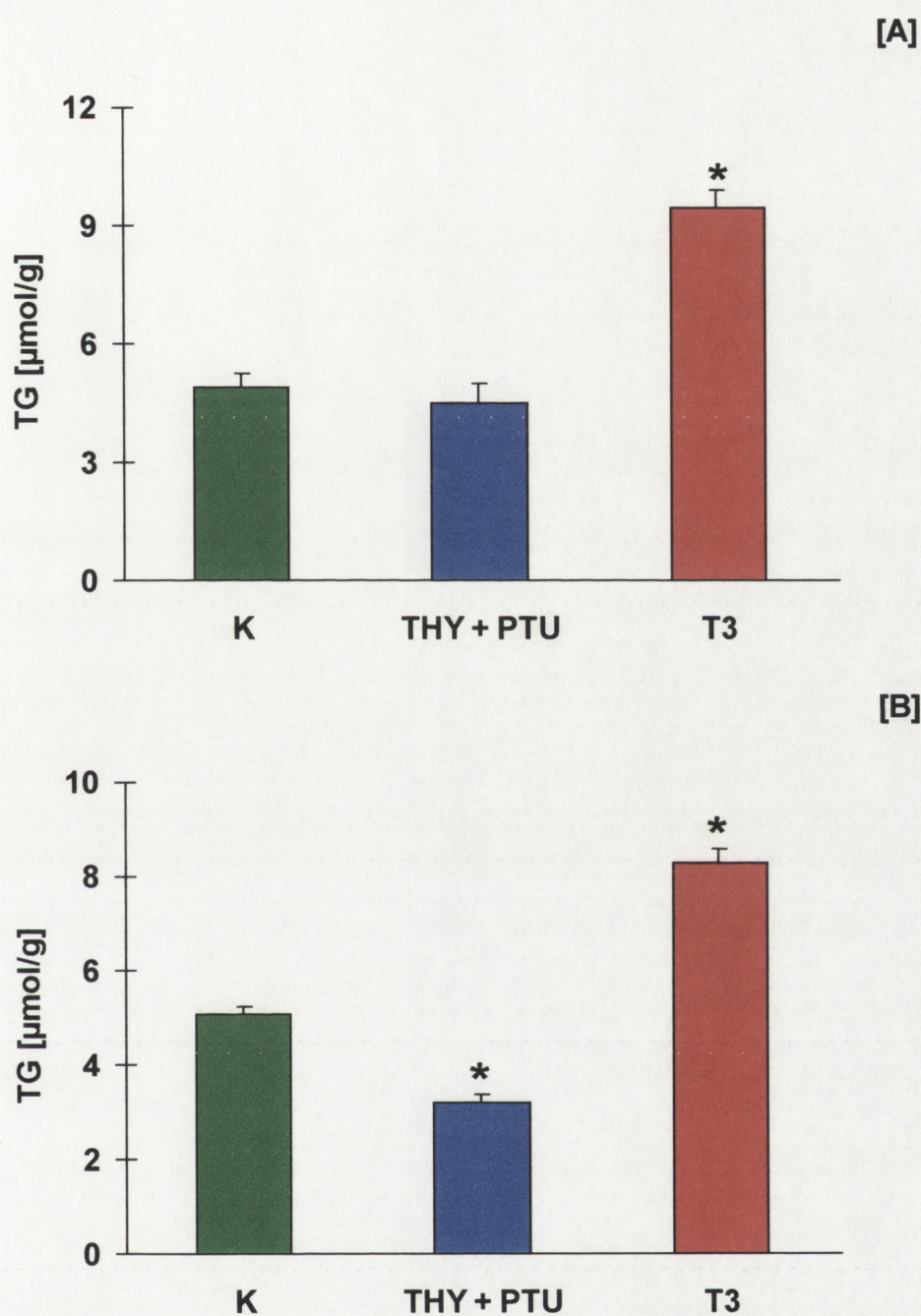
Zanik ^{14}C -TG-chylomikronów z krwi szczurów o normalnej aktywności ruchowej (Ryc.13 i Tab. 2) miał charakter liniowy podczas pierwszych 10 min. doświadczenia a okres półtrwania ($t_{1/2}$) znakowanych chylomikronów wynosił $5,1 \pm 0,4$ min. u zwierząt z grupy kontrolnej, $3,9 \pm 0,2$ min. u szczurów z grupy T3 ($p < 0,05$) i $3,1 \pm 0,2$ min. w grupie THY+PTU ($P < 0,05$). Jak już wspomniano w rozdziale Materiał i Metody potreningowe tempo zaniku ^{14}C -TG chylomikronów z krwi określono jedynie u szczurów z grupy kontrolnej oraz u zwierząt z grupy THY+PTU (Ryc.14 i Tab. 2). U zwierząt kontrolnych stwierdzono istotne ($p < 0,05$) przyspieszenie tempa usuwania



Ryc. 11

Zawartość triacylogliceroli (TG) w mięśniu płaszczkowatym [A] i sercowym [B] szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) po jednorazowym wysiłku.

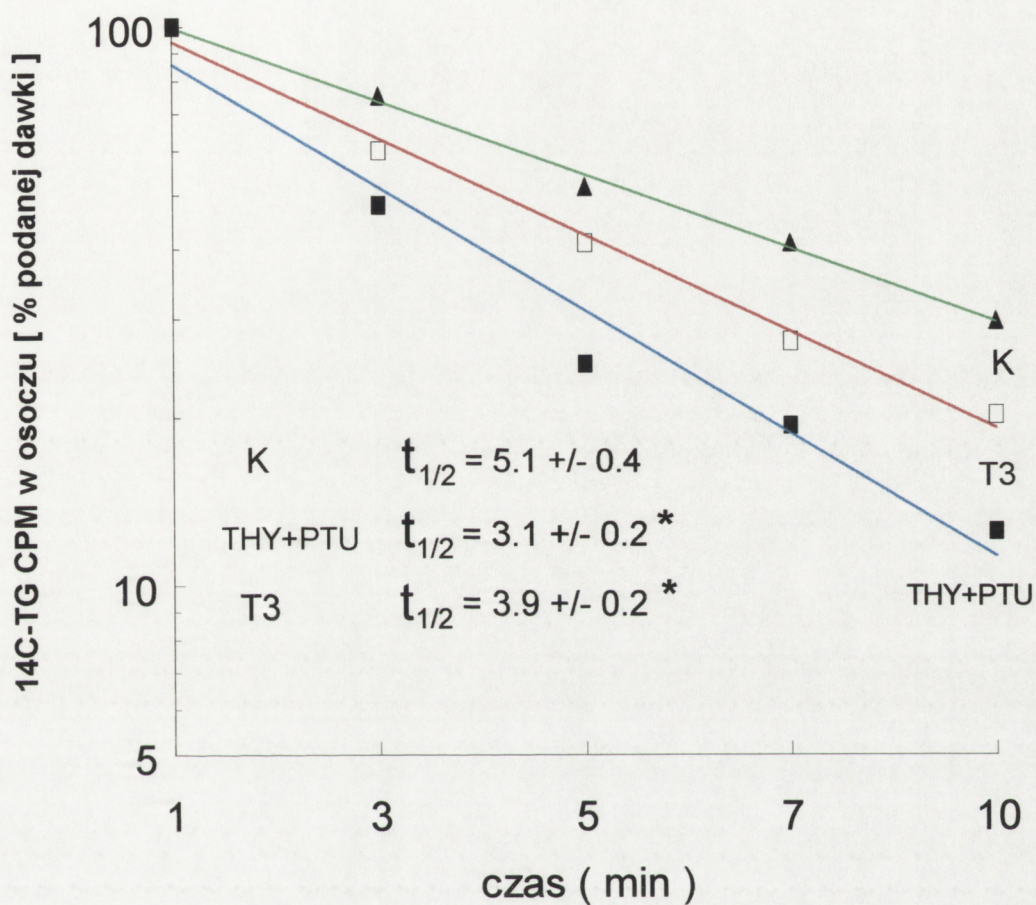
Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.



Ryc. 12

Zawartość triacylogliceroli (TG) w mięśniu płaszczkowatym [A] i sercowym [B] szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) po treningu.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.



Ryc. 13

Zanik ^{14}C - TG chylomikronów z krwi szczurów grupy kontrolnej (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3).

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.
 $t_{1/2}$ - okres półtrwania ^{14}C -TG chylomikronów we krwi.

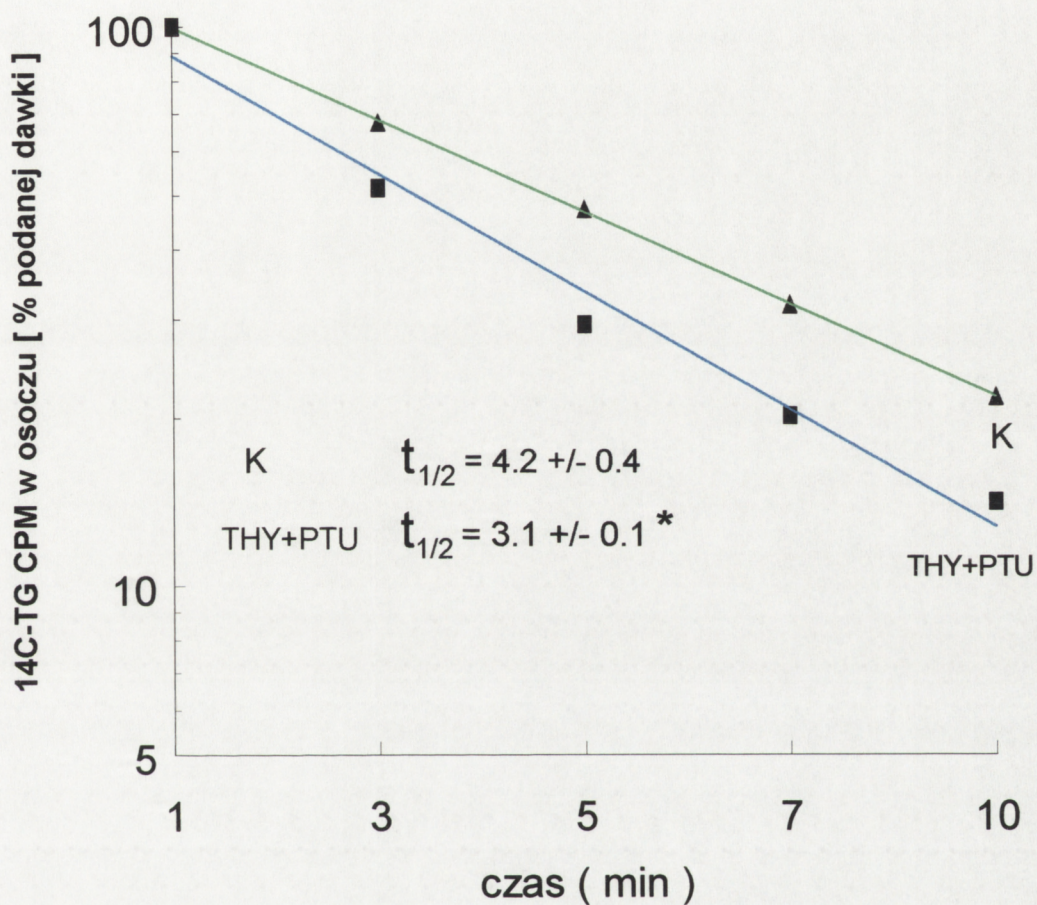
Tabela 2

Obrót ^{14}C -TG chylomikronów osocza szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY + PTU) oraz z ich nadmiarem (T3) w warunkach normalnej aktywności ruchowej (S) i po treningu (T).

Grupa	Stan	V osocza ml	TG osocza mmol/l	Tempo obrotu K, min. ⁻¹	Obrót TG osocza $\mu\text{mol}/\text{min.}$	T _{1/2} TG osocza min.
K	S	9,77 ± 0,16	1,30 ± 0,07	0,14	1,78	5,04
	T	11,70 ± 0,11 [†]	1,08 ± 0,12	0,17	2,05	4,16 [†]
THY + PTU	S	7,50 ± 0,13*	0,64 ± 0,04*	0,23	1,10	3,06*
	T	8,51 ± 0,18* [†]	0,60 ± 0,08*	0,23	1,17	3,08*
T3	S	9,30 ± 0,13	1,95 ± 0,16*	0,18	3,26	3,94*

V - objętość, t_{1/2} - okres półtrwania ^{14}C -TG chylomikronów w osoczu

Podano średnią arytmetyczną i błąd standardowy. Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt kontrolnych i u zwierząt z niedoborem i nadmiarem hormonów tarczycy ; krzyżykami (†) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt w stanie spoczynku oraz zwierzętami po treningu.



Ryc. 14

Zanik ^{14}C - TG chylomikronów z krwi szczurów grupy kontrolnej (K) oraz szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) po treningu.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K i grupy THY+PTU.

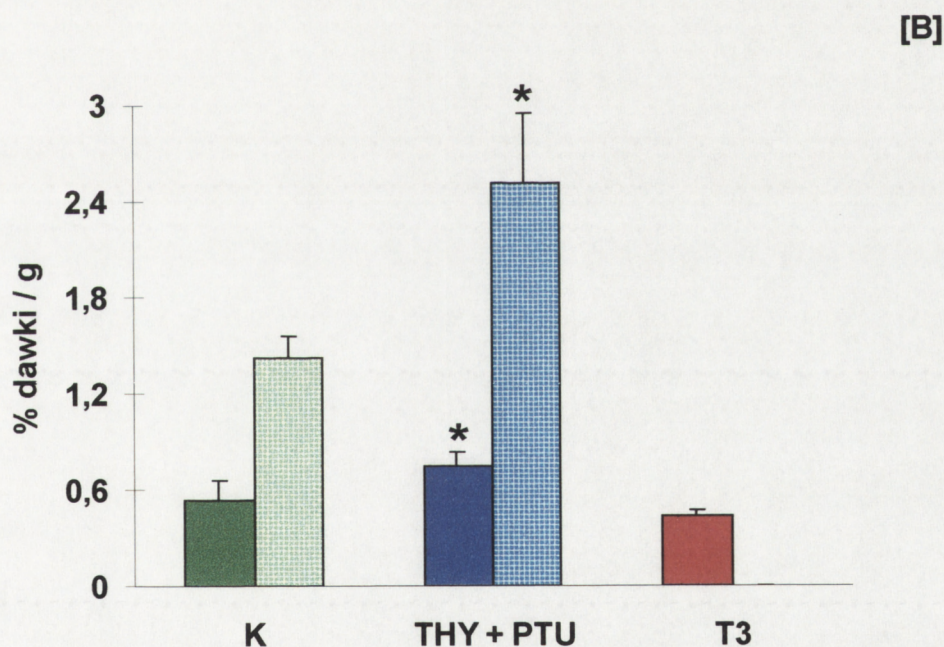
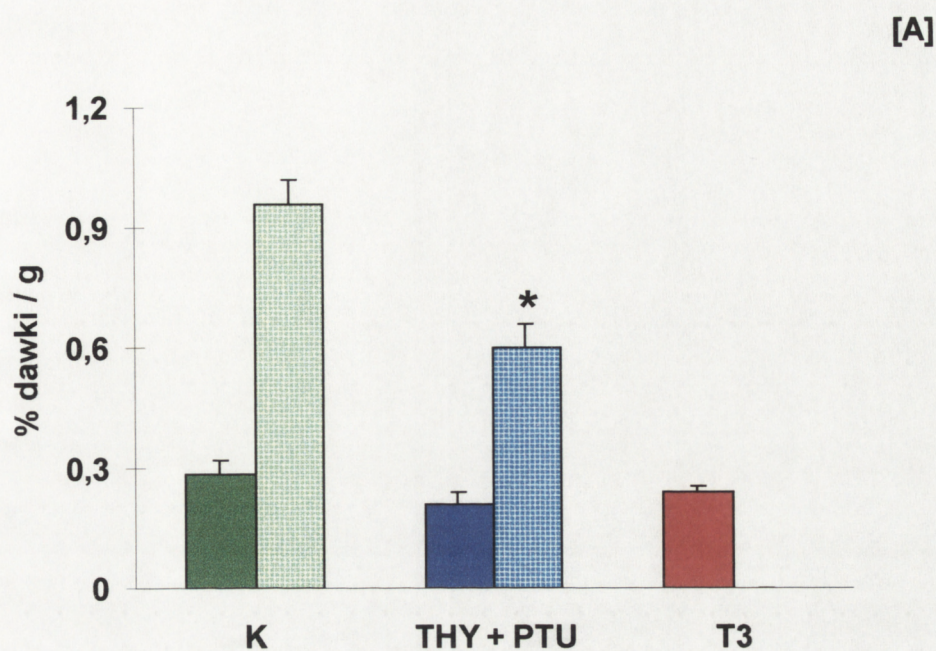
$t_{1/2}$ - okres półtrwania C^{14} -TG chylomikronów we krwi.

egzogennie podanych chylomikronów ($t_{1/2} = 4,16$ min. vs $5,04$ min. w spoczynku). U szczurów THY+PTU okres półtrwania chylomikronów we krwi nie uległ zmianie pod wpływem treningu w porównaniu z wartościami osiąganymi w warunkach normalnej aktywności ruchowej.

Objętość osocza była zbliżona w grupie szczurów kontrolnych i u zwierząt po iniekcji trijodotyroniny i wynosiła odpowiednio $9,77 \pm 0,16$ i $9,30 \pm 0,13$ ml. U szczurów THY+PTU objętość osocza była istotnie ($p < 0,05$) obniżona do $7,5 \pm 0,13$ ml w porównaniu ze stwierdzoną u zwierząt z pozostałych 2 grup i zwiększała się istotnie ($p < 0,01$) po treningu osiągając wartość $8,51 \pm 0,18$ ml (Tab.2).

Stężenie TG osocza różniło się istotnie między grupami i wynosiło $1,30 \pm 0,07$ mmol/l u szczurów kontrolnych, $0,64 \pm 0,04$ mmol/l w grupie THY+PTU a w grupie T3 $1,95 \pm 0,16$ mmol/l ($p < 0,01$; Tab.2). Trening nie spowodował istotnych zmian stężenia TG osocza w żadnej z grup. Wyliczony szacunkowo (z uwagi na możliwy wpływ podanych egzogennie TG na całkowitą pulę TG osocza) obrót TG w ciągu minuty wynosił ok. $1 \mu\text{mol}/\text{min}$ w grupie zwierząt THY+PTU, ok. $2 \mu\text{mol}/\text{min}$ w grupie kontrolnej i ponad $3 \mu\text{mol}/\text{min}$ w grupie T3 (Tab.2). Pięcioletniowy trening spowodował niewielki wzrost tempa obrotu TG osocza jedynie w grupie kontrolnej.

Wychwyty znakowanych WKT z TG-chylomikronów przez mięsień płaszczkowy szczurów o normalnej aktywności ruchowej był zbliżony we wszystkich badanych grupach, wzrósł natomiast bardzo znacznie po treningu zarówno u szczurów z grupy K jak i THY+PTU (Ryc.15). Ilość znakowanych WKT wychwyconych przez mięsień sercowy była istotnie wyższa u zwierząt z niedoborem hormonów tarczycy w porównaniu z pozostałymi 2 grupami szczurów. Trening fizyczny spowodował ok. 3-krotne zwiększenie wychwyty znakowanych WKT z TG-chylomikronów przez ten mięsień, zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie THY+PTU.



Ryc. 15

Wychwyty ^{14}C -WKT pochodzących z hydrolizy chylomikronów przez mięsień płaszczkowy [A] i sercowy [B] szczurów grupy kontrolnej (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz ich nadmiarem (T3) w warunkach normalnej aktywności ruchowej (słupki pełne) i po treningu (słupki kratkowane).

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi u zwierząt z grupy K oraz u zwierząt z grup THY+PTU i T3.

6. DYSKUSJA

Udział hormonów, a wśród nich hormonu tarczycy - trijodotyroniny w kontroli syntezy, transportu i działania LPL w mięśniach szkieletowych jest dotychczas nie w pełni wyjaśniony. Wykazano natomiast, że rola T_3 w metabolizmie lipoprotein osocza jest niezwykle ważna ponieważ zmiana stanu czynnościowego tarczycy powoduje szereg modyfikacji w syntezie i wydzielaniu TG-VLDL (Keyes i wsp. 1981, Wilcox i wsp. 1982, Dolphin i Forsyth 1983) oraz syntezie i metabolizmie apolipoprotein (Dory i Roheim, 1981, Davidson i wsp. 1988). Apolipoproteiny są strukturalnymi składnikami lipoprotein osocza i służą jako miejsce rozpoznania podczas wychwytu przez tkanki lub jako aktywatory dla enzymów zaangażowanych w metabolizm lipoprotein.

Okazało się, że istotną rolę w metabolizmie TG odgrywa współzależność pomiędzy ekspresją apoA-IV i apoC-III. ApoA-IV ułatwia bowiem przeniesienie ApoC-II, aktywatora LPL, na lipoproteiny bogate w TG przez co wzmacnia ich katabolizm (Goldberg i wsp. 1990), ApoC-III działa natomiast przeciwnie hamując aktywność LPL (Wang i wsp. 1985) oraz usuwanie cząsteczek resztkowych, w czym pośredniczy ApoE (Windler i Havel 1985). Wykazano, że ekspresja genów dla tych apoprotein znajduje się pod kontrolą hormonu tarczycy (Lin-Lee i wsp. 1993).

Zmianom stanu czynnościowego tarczycy towarzyszą również zmiany strukturalne i czynnościowe mięśni szkieletowych. W mięśniu płaszczkowatym szczura, który składa się głównie z włókien wolnokurczliwych (ST) stwierdzono m.inn. znaczne skrócenie trwania skurczu oraz zmiany w składzie ciężkich i lekkich izoform miozyny pod wpływem nadmiaru T_3 (Li i Larsson 1997). Sillau (1985) stwierdził, że T_3 zwiększa w tym mięśniu kapilaryzację, wpływa na wzrost pojemności tlenowej oraz konwersję włókien ST do FT (van der Linden i wsp. 1996). Zmiany te zanikają jednak po

normalizacji stężenia T_3 we krwi. Stan niedoczynności tarczycy, wywołany podawaniem PTU, powoduje zmiany w odwrotnym kierunku niż podawanie T_3 , czyli zwiększenie liczby włókien ST (typu I) i zmniejszenie pojemności tlenowej mięśnia, nie stwierdzono jednak wpływu na kapilaryzację (Sillau 1985a).

Mięsień sercowy gryzoni ma wyjątkowe właściwości w stanie eutyreozy. Charakteryzuje go duża kurczliwość, wysoka aktywność ATP-azy miozynowej i duża pojemność tlenowa, co przypomina serce innych zwierząt w stanie nadczynności tarczycy (Haddad i wsp. 1998). Pomimo tego podanie szczurom T_3 powoduje wzrost częstości skurczów serca i rozwój hipertrofii tego mięśnia (Cappelli i wsp. 1988). Stan niedoczynności tarczycy wprowadza natomiast serce szczura w stan hipokinetyczny (Dillmann 1990).

Wpływ niedoboru i nadmiaru hormonów tarczycy na niektóre wskaźniki metabolizmu lipidów szczura

W obecnej pracy niedobór hormonów tarczycy u szczurów wywoływano poprzez usunięcie tarczycy a następnie, w tydzień po operacji, podawanie PTU w wodzie pitnej w celu zapobieżenia reakcji odjodowania tetrajodotyroniny do T_3 . Stan ten znalazł swoje odzwierciedlenie w znaczącym obniżeniu stężenia T_4 i T_3 we krwi, czemu towarzyszyło wyraźnie zmniejszenie masy ciała i tempa wzrostu zwierząt. Podobne zmiany opisali inni autorzy (Johnson i wsp. 1983, Moreno i wsp. 1997), chociaż często u szczurów u których wywoływano doświadczalnie obniżenie stężenia jodotyronin nie stwierdzano zmian masy ciała (Sillau 1985a).

Stan nadmiaru hormonów tarczycy uzyskiwano u zwierząt doświadczalnych poprzez podawanie T_3 w podskórnych iniekcjach co spowodowało wzrost stężenia tego hormonu we krwi o blisko 300%. Stwierdzono równocześnie u tych szczurów

zmniejszenie początkowej masy ciała o 15-20%, podczas gdy zwierzęta kontrolne przybierały na wadze o 10-15% przez okres 3 dni, co może się wiązać m.inn. ze wzmożoną pobudliwością zwierząt którym podawano trijodotyroninę. Podobne zjawisko obserwowali inni autorzy (Larsson i wsp. 1994, Oppenheimer i wsp. 1991), a Sillau (1985) stwierdził że dzieje się tak przez okres pierwszych kilku dni podawania T_3 , natomiast po dłuższym okresie suplementacji T_3 zwierzęta doświadczalne przybierają na wadze i ich masa ciała nie różni się od zwierząt kontrolnych.

Pod wpływem zmiany stanu czynnościowego tarczycy następuje szereg zmian w stężeniu wielu składników krwi, w tym również związków lipidowych. W obecnej pracy u zwierząt, którym obniżono stężenie T_4 i T_3 we krwi stwierdzono podwyższenie poziomu WKT (do 145% w stosunku do kontroli) oraz znaczne obniżenie stężenia TG (o ok. 50% wartości stwierdzanej u szczurów kontrolnych). Zmiany stężenia TG w osoczu wykazano w większości badań dotyczących szczurów z doświadczalnie wywołaną niedoczynnością tarczycy (Eckel 1987, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1981) i ten obniżony poziom TG utrzymywał się przez cały okres trwania hipotyreozy. Powodem tak istotnego obniżenia TG we krwi zwierząt, podobnie jak w obecnej pracy, mogła być stwierdzona wysoka aktywność LPL w mięśniach oraz w tkance tłuszczowej (Borensztajn 1987, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, Ong i wsp. 1994, Saffari i wsp. 1992, Skottova i wsp. 1983, Eckel 1987). Zwiększona aktywność LPL mogła też przyczynić się do znaczącego wzrostu stężenia WKT we krwi tych zwierząt.

Nadmiar T_3 spowodował natomiast podwyższenie stężenia zarówno WKT jak i TG we krwi badanych zwierząt. Wzrost stężenia WKT można wiązać z dobrze znanym wpływem T_3 na zwiększenie lipolizy stymulowanej przez katecholaminy w tkance tłuszczowej tzw. efekt ułatwiający (permissive effect) (Bilezikian i Loeb 1983, Goodman

i Bray 1966, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1975). W świetle badań ostatnich kilku lat wydaje się jednak, że wiązanie tego procesu z bezpośrednim wpływem katecholamin na aktywność lipazy hormono-wrażliwej w tych warunkach nie jest w pełni uzasadnione (Oppenheimer i wsp. 1991). Z danych piśmiennictwa wiadomo, że u szczurów którym podawano T_3 obniża się synteza i wydzielanie VLDL przez wątrobę, co może wiązać się z zahamowaniem syntezy wątrobowych TG (Wilcox i Heimberg, 1991). Za podwyższony poziom TG w badanej grupie mogą być więc raczej odpowiedzialne TG pochodzące z chylomikronów oraz zmniejszona lipoliza w mięśniach szkieletowych, ponieważ aktywność obu form LPL w mięśniu płaszczkowatym i sercowym szczurów z hipertyreozą jest, jak wynika z badań własnych, znacząco obniżona.

Aktywność dwóch form LPL w mięśniu płaszczkowatym i sercowym w warunkach niedoboru i nadmiaru hormonów tarczycy

Kontrola syntezy i aktywności LPL jest procesem złożonym zachodzącym na wielu poziomach regulacyjnych (Enerback i Gimble 1993). Wydaje się, że większość istotnych regulacji fizjologicznych tego enzymu zachodzi na poziomie translacji i zmian po-translacyjnych, jak np. wzrost aktywności LPL w tkance tłuszczowej po spożyciu pokarmu (Doolittle i wsp. 1990). O tym, że zmiany stanu czynnościowego tarczycy mogą modyfikować aktywność LPL wiedziano od dawna (patrz Borensztajn 1987), lecz nie poświęcono temu zagadnieniu zbyt wiele uwagi. Dopiero w ostatnich paru latach pojawiło się kilka prac, których autorzy starali się wyjaśnić mechanizm tego zjawiska na poziomie komórkowym (Saffari i wsp. 1992, Kern i wsp. 1996). Prace te dotyczą jednak w większości kontroli LPL w tkance tłuszczowej a nie w mięśniach.

Podobnie jak inni autorzy (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, 1981, Borensztajn 1987), w obecnej pracy stwierdzono wzrost aktywności LPL w mięśni płaszczkowatym szczurów z niedoborem hormonu tarczycy. W badaniach własnych, w odróżnieniu od wyżej wymienionych, nie oznaczano jednak aktywności całkowitej enzymu, lecz aktywność dwóch form LPL: zewnątrzkomórkowej, połączonej ze śródbłonkiem naczyniowym, która aktywnie hydrolizuje TG-chylomikronów i VLDL oraz formy wewnątrzkomórkowej, nieaktywnej która może w odpowiedzi na właściwy bliżej niesprecyzowany sygnał być aktywowana i uwolniona, bądź zdegradowana. I tak w porównaniu ze szczurami kontrolnymi w grupie zwierząt z doświadczalnie wywołaną hipotyreozą w mięśni płaszczkowatym stwierdzono blisko trzykrotny wzrost aktywności formy naczyniowej (zewnątrzkomórkowej) enzymu, któremu towarzyszył dwukrotny wzrost aktywności formy wewnątrzkomórkowej. Podobny wzrost aktywności formy naczyniowej LPL w mięśni płaszczkowatym szczurów z niedoborem hormonów tarczycy opisali Ong i wsp. (1994), nie stwierdzili oni natomiast zmian w wewnątrzkomórkowej formie LPL. Zawartość triacylogliceroli w mięśni płaszczkowatym była tylko nieznacznie (NS) zwiększona.

W sercu szczurów z obniżonym poziomem T_3 i T_4 we krwi, podobnie jak w mięśni płaszczkowatym, aktywność obu form enzymu była bardzo wysoka, a zawartość TG nieco wyższa niż u zwierząt kontrolnych, lecz niższa niż w grupie szczurów którym podawano T_3 . W tym przypadku dane piśmiennictwa są mniej jednoznaczne: w sercu szczurów z hipotyreozą opisywano zarówno wzrost (Keig i Borensztajn 1974, Hansson i wsp. 1983, Ong i wsp. 1994) jak i obniżenie lub brak zmian aktywności LPL (Mallov, Alousi 1967, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980). Przyczyna tych rozbieżności i mechanizm ewentualnych zmian aktywności LPL przy niedoborze hormonu tarczycy wydają się w dalszym ciągu niejasne. W tkance tłuszczowej natomiast

stwierdzono znaczny wzrost aktywności LPL u szczurów z niedoczynnością tarczycy (Eckel 1987, Saffari i wsp. 1992).

W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu nowych technik zaczęto badać wpływ różnych stanów metabolicznych i hormonalnych na regulację LPL na poziomie procesów transkrypcji, translacji i zmian potranslacyjnych (Goldberg i wsp. 1989, Doolittle i wsp. 1990, Kern i wsp. 1990, Friedman i wsp. 1991, Simsolo i wsp. 1992, Bergo i wsp. 1996). Saffari i wsp. (1992) stwierdzili, że w stanie niedoczynności tarczycy wzrasta tempo syntezy, masa immunoreaktywna oraz aktywność LPL w tkance tłuszczowej, a właściwa regulacja zachodzi na poziomie translacji bądź procesów po-translacyjnych. Kontynuując te badania Kern i wsp. (1996) wykazali, że w cytoplazmie adipocytów zlokalizowany jest czynnik represorowy dla procesu translacji (translation repressor factor). Badacze ci stwierdzili, że pobudzenie procesu translacji powodujące następnie wzrost aktywności LPL w tkance tłuszczowej szczurów z niedoczynnością tarczycy związane jest z kilkukrotnym obniżeniem aktywności tego czynnika represorowego. Podobny brak czynnika represorowego w cytoplazmie, prowadzący do wzrostu aktywności LPL stwierdzili także w sercu szczurów z hipotyreozą, nie zaobserwowali tego natomiast w wątrobie i nerce.

We wcześniejszej pracy Ong i wsp. (1994), badając zmiany aktywności LPL w mięśniu płaszczkowatym i sercu szczura w stanie niedoczynności tarczycy stwierdzili, że wzrost aktywności enzymu wynika prawdopodobnie z zaangażowania innego mechanizmu regulacyjnego niż w przypadku tkanki tłuszczowej. Wykazali bowiem, że w obu badanych mięśniach niedobór T_3 powoduje znaczny wzrost aktywności naczyniowej formy enzymu przy braku istotnych zmian formy komórkowej. Ze względu na to, że ilość białka enzymatycznego (masa immunoreaktywna) LPL nie zmieniła się, autorzy

sugerowali, że niedoczynność tarczycy wpływa na lipazę lipoproteinową poprzez mechanizmy po-translacyjne, jak dotąd niewyjaśnione.

W obecnej pracy stwierdzono bardzo znaczny wzrost aktywności nie tylko formy zewnątrzkomórkowej LPL lecz także formy wewnątrzkomórkowej enzymu, zarówno w mięśniu płaszczkowatym jak i w sercu szczurów z niedoborem hormonów tarczycy w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wynik ten może sugerować, że również w mięśniach regulacja aktywności enzymu zachodzi wskutek zmian na poziomie translacji. W sercu szczurów stwierdzono (Kern i wsp.1996) obecność cytoplazmatycznego czynnika represorowego dla translacji, który jest pod kontrolą hormonu tarczycy, toteż wydaje się prawdopodobne, że w cytoplazmie miocytów taki czynnik występuje i jego ilość może zmieniać się w zależności od stanu czynnościowego tarczycy.

Sugerowana możliwość regulacji aktywności LPL przez hormony tarczycy na poziomie translacji nie wyklucza kontroli po-translacyjnej. Uważa się, że naczyniowa, aktywna forma LPL w mięśniach szkieletowych zwierząt kontrolnych stanowi tylko ok. 5% jej masy, co świadczy jak mała frakcja enzymu mięśniowego jest aktywna i powiązana z glikozaminoglikanem śródbłonna naczyniowego. Większość enzymu pozostaje w formie wewnątrzkomórkowej, nieaktywnej, co stwarza duże potencjalne możliwości regulacji na drodze aktywacji, sekrecji czy degradacji enzymu (Ben-Zeev i wsp. 1992, Simsolo i wsp. 1992, Carroll i wsp.1992).

Postulowano również wpływ dostępności pokarmu na zmiany aktywności LPL w stanie niedoboru hormonu tarczycy (Hansson i wsp. 1983). Wiadomo, że szczury z hipotyreozą jedzą mniej od zwierząt kontrolnych i wolniej przybierają na wadze. Uważano więc, że za wzrost aktywności LPL w mięśniach może być odpowiedzialny stan chronicznego

niedożywienia tych zwierząt. Prawdopodobnie stan czynnościowy tarczycy i stan odżywienia organizmu mogą w pewnym zakresie oddziaływać łącznie na regulację aktywności LPL w mięśniach.

Cryer (1987) w pracy przeglądowej przytacza wiele przykładów świadczących, że w odpowiedzi na bodźce pokarmowe czy hormonalne wzrasta aktywność LPL w tkance tłuszczowej towarzyszy obniżenie aktywności enzymu w mięśniach. W przypadku hipotyreozy wyniki obecnej pracy wraz z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, Saffari i wsp. 1992, Kern i wsp. 1996, Ong i wsp. 1994) świadczą raczej o podobnym oddziaływaniu niedoboru hormonu tarczycy we krwi na tkankę tłuszczową, mięśnie szkieletowe i serce, jako że we wszystkich tych tkankach stwierdzono znaczący wzrost aktywności LPL w tym stanie.

Interesujące wyniki uzyskano w badaniach wykonanych u transgenicznych myszy (Levak-Frank i wsp. 1995), u których wywołano nadekspresję ludzkiej LPL w mięśniach szkieletowych i w sercu, uzyskując stan przypominający niedobór hormonu tarczycy, z równoczesnym zablokowaniem ekspresji LPL w pozostałych tkankach. U myszy tych stwierdzono upośledzenie metabolizmu energetycznego i przemian lipidowych. Wykazano, że wzrost aktywności lipolitycznej mięśni, zwłaszcza szkieletowych prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia WKT, a w jego następstwie rozwija się miopatia charakteryzująca się m.inn. proliferacją mitochondriów i peroksyzomów oraz atrofią i degeneracją włókien mięśniowych. Zmiany te były zależne wyłącznie od stopnia i czasu trwania zwiększonej aktywności LPL w mięśniach. Stężenie WKT we krwi było jednak niezmienione, co wskazuje że większość uwalnianych w procesie hydrolizy TG kwasów tłuszczowych trafiało do wnętrza miocytów. Przeprowadzenie analogii między transgenicznymi myszami z nadekspresją LPL i zmianami towarzyszącymi hipotyreozie

jest ryzykowne, lecz w świetle wyników uzyskanych u tych myszy nie można wykluczyć, że zmiany w mięśniach opisywane u zwierząt z obniżonym poziomem hormonów tarczycy we krwi wynikają nie tylko z niedoboru tych hormonów lecz również mogą być spowodowane znacznie zwiększoną aktywnością LPL.

Jak stwierdzono w obecnej pracy u szczurów z nadmiarem T_3 aktywność LPL w mięśniu płaszczkowatym jest bardzo niska. Dotyczy to zwłaszcza formy zewnątrzkomórkowej enzymu (ok. 1/3 aktywności LPL zwierząt kontrolnych). Zawartość TG w tym mięśniu była natomiast znacząco podwyższona. W mięśniu sercowym zwierząt z nadmiarem krążącej T_3 również wykazano znacznie obniżoną aktywność obu form LPL (o ok. 25-30%), któremu towarzyszyła, podobnie jak w mięśniu płaszczkowatym zwiększona zawartość TG. Wyniki uzyskane przez innych autorów dotyczące aktywności LPL w doświadczalnie wywołanej hipertyreozie są niejednoznaczne. Stwierdzono zarówno obniżenie (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980,) jak i podwyższenie (Wilson i wsp. 1977,) aktywności LPL w mięśniu płaszczkowatym. Również w sercu niektórzy autorzy (Alousi i Mallov 1964, Torsti 1965, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980) opisali zwiększoną aktywność LPL co wiązali z koniecznością podtrzymywania wysokiego tempa metabolizmu w tych warunkach. Badania własne, w których stwierdzono znaczące obniżenie obu form enzymu, tak w mięśniu płaszczkowatym jak i sercowym już po 3 dniach podawania trijodotyroniny wskazywać mogą na hamujący wpływ nadmiaru tego hormonu na proces syntezy enzymu i regulację po-translacyjną. Zakładając, że niedobór T_3 powoduje zahamowanie syntezy translacyjnego czynnika represorowego można przypuszczać, że nadmiar tego hormonu pobudza jego produkcję prowadząc do zahamowania translacji LPL a w konsekwencji do znacznego obniżenia aktywności LPL.

Należy jednak pamiętać, że ilość aktywnych cząsteczek LPL w śródbłonku naczyniowym u szczurów z eutyreozą jest w dużym nadmiarze w stosunku do zapotrzebowania, więc nawet znacznie obniżona aktywność enzymu, którą stwierdzono w obecnej pracy u szczurów z nadmiarem T_3 we krwi może okazać się fizjologicznie wystarczająca z uwagi na zwiększoną kapilaryzację mięśni i szybszy przepływ przez nie krwi u tych zwierząt.

Modyfikujący wpływ hormonów tarczycy na zanik chylomikronów z krwi i wychwyty wolnych kwasów tłuszczowych pochodzących z triacylogliceroli chylomikronów przez mięśnie

Zanik znakowanych chylomikronów z krwi, odzwierciedlający zarówno tempo hydrolizy TG w naczyniach kapilarnych jak i ich wychwyty przez wątrobę był wyraźnie szybszy zarówno w grupie z obniżonym jak i podwyższonym poziomem hormonów tarczycy we krwi w porównaniu z grupą kontrolną. Wskazuje to na brak współzależności między poziomem krążących we krwi hormonów a zanikiem egzogennych chylomikronów z krwi co sugerowali już poprzednio Nikkila i Kekki (1972) oraz Tulloch i wsp. (1973). Jednakże Kaciuba-Uściłko i wsp. (1980), którzy nie stwierdzili różnicy w tempie usuwania ^{14}C -TG chylomikronów z krwi między szczurami kontrolnymi i z hipotyreozą, wykazali wyraźnie szybszy zanik znakowanych chylomikronów u zwierząt z doświadczalnie wywołaną hipertyreozą. Autorzy ci wiązali uzyskane wyniki z faktem, że badane przez nich zwierzęta były nakarmione i to mogło mieć wpływ na tempo zaniku TG z krwi.

LPL oprócz funkcji hydrolitycznej może także wywierać inny wpływ na metabolizm chylomikronów. Dzięki powinowactwu do cząsteczek lipoprotein enzym ten ułatwia m.in. czasowe wiązanie chylomikronów ze śródbłonkiem naczyniowym co

stymuluje, zarówno hydrolizę TG jak i wychwyty uwolnionych WKT (Goldberg 1996). W procesie tym odgrywa również rolę ilość apoprotein, zwłaszcza apoE, które to białko silnie wiążące heparynę „zakotwicza” chylomikrony w śródbłonku poprzez zespolenie z siarczanem heparanu proteoglikanów (Goldberg 1996). U szczurów z hipertyreozą stwierdzono obniżony poziom apoE we krwi (Wilcox i Heimberg 1991), natomiast u zwierząt z niedoborem T_3 znaczny wzrost stężenia tej apoproteiny (Dory i Roheim 1981). Biorąc pod uwagę to, że u badanych w obecnej pracy zwierząt z niedoborem T_3 aktywność LPL była znacząco podwyższona w obu badanych mięśniach, a przypuszczalnie dotyczy to również stężenia apoE we krwi, możnaby sugerować, że zwiększone przyleganie chylomikronów do śródbłonka jest przyczyną najszybszego zaniku znakowanych chylomikronów z krwi w tej grupie szczurów.

Lipoliza chylomikronów pod wpływem LPL jest pierwszym etapem ich przemian katabolicznych prowadzącym do powstania „chylomikronów reszkowych”. Te ostatnie są szybko wychwytywane przez wątrobę po związaniu się z białkami receptorowymi na jej powierzchni (Havel i Hamilton 1988, Windler i wsp. 1988). W procesie tym pośredniczy również LPL (Skottova i wsp. 1995).

Lipaza lipoproteinowa jest nie tylko niezbędna dla katabolizmu lipoprotein bogatych w triacyloglicerole, ale w niektórych tkankach, takich jak tłuszczowa czy mięśniowa lokalna aktywność tego enzymu determinuje ilość wychwytywanych przez tkankę WKT pochodzących z hydrolizy TG. Jak już wspomniano, coraz więcej jest dowodów na to, że LPL jest ligandem umożliwiającym związanie takich cząsteczek lipoprotein jak chylomikrony reszkowe z receptorami i powierzchnią komórek (Olivecrona i wsp. 1995). Można więc oczekiwać, że im wyższa jest aktywność formy naczyniowej LPL, tym większe tempo lipolizy i wyższe lokalne stężenie WKT

sprzyjające zwiększonemu ich wychytowi przez otaczające tkanki ale również oderwaniu lipazy wraz z lipoproteinami od śródbłonna. Prowadzić to może do sprawniejszego usuwania tych reszkowych cząsteczek z krwiobiegu.

W latach 70-tych stwierdzono istnienie współzależności pomiędzy wychwytem WKT pochodzących z TG-chylomikronów przez mięśnie szkieletowe a aktywnością LPL w mięśniach o różnym składzie włókien (Linder i wsp.1976, Tan i wsp 1977). Wykazano ponadto, że w mięśniach o przewadze włókien wolnokurczliwych, oksydacyjnych (ST) takich jak mięsień płaszczkowy zarówno wychyt WKT jak i aktywność enzymu są najwyższe. Ze względu na to, że stan czynnościowy tarczycy istotnie wpływa na aktywność formy naczyniowej LPL w mięśniach w obecnej pracy uznano za ważne sprawdzenie czy zmiany stężenia krążącej we krwi T_3 wpływają na wychyt znakowanych WKT chylomikronów przez mięsień płaszczkowy oraz mięsień sercowy. Wykazano iż pomimo bardzo dużej aktywności naczyniowej, zewnątrzkomórkowej formy LPL u zwierząt z niedoborem hormonów tarczycy wychyt kwasów tłuszczowych pochodzących z hydrolizy TG chylomikronów przez mięsień płaszczkowy nie ulega zmianie w porównaniu ze stwierdzonym u zwierząt kontrolnych, natomiast w sercu był on nieznacznie podwyższony. U szczurów z nadmiarem T_3 również nie stwierdzono zmian w wychycie znakowanych WKT ani przez mięsień płaszczkowy ani przez mięsień sercowy pomimo że w tych warunkach aktywność naczyniowej formy LPL była istotnie obniżona w obydwu mięśniach. Brak większych różnic w wychycie WKT pochodzących z hydrolizy TG-chylomikronów może wskazywać na dominujący wpływ innych czynników poza aktywnością zewnątrzkomórkowej LPL na ten proces. Można by przypuszczać, że istotne znaczenie ma tu zmodyfikowana struktura mięśni, ich kapilaryzacja oraz przepływ krwi, jak również aktywność metaboliczna mięśni tak różna w obydwu grupach zwierząt

(Kaciuba-Uściłko i wsp.1980). W badaniach obecnej pracy wychwyty ^{14}C -WKT przez mięśnie mierzono po 10 min. od podania znakowanych chylomikronów, czyli po zakończeniu pomiaru tempa zaniku chylomikronów z krwiobiegu. Ze względu na brak oznaczeń dwutlenku węgla, nic nie wiadomo na temat ilości kwasów tłuszczowych, które mogły ulec ewentualnemu utlenieniu w mięśniach w tym czasie. Nie można więc wykluczyć, że wybrany sposób pomiaru wychwyty przez tkanki WKT uwolnionych ze znakowanych chylomikronów nie był optymalny dla wykazania ewentualnej roli hormonów tarczycy w tym procesie.

Uzyskane w obecnej pracy wyniki wydają się jednak podtrzymywać tezę (Olivecrona i wsp.1997), że potencjalne możliwości hydrolizy TG wyrażające się aktywnością LPL w danej tkance nie muszą determinować miejsca i wielkości wychwyty uwolnionych w tym procesie kwasów tłuszczowych.

Wpływ zwiększonej aktywności ruchowej na metabolizm lipidów u szczurów z niedoborem lub nadmiarem hormonów tarczycy

Mięśnie szkieletowe stanowią na ogół największą tkankę organizmu i zużywają w warunkach normalnej aktywności ok. 30% tlenu, natomiast podczas długotrwałego wysiłku fizycznego o dużej intensywności zużycie tlenu przez tę tkankę wzrasta nawet do 90% (patrz Kozłowski i Nazar 1995). Głównymi substratami energetycznymi wykorzystywanymi przez mięśnie do resyntezy ATP, podstawowego źródła energii do skurczu, są fosfokreatyna, glikogen mięśniowy oraz glukoza i WKT. Pracujące mięśnie mogą również wykorzystywać związki ketonowe, mleczan i niektóre aminokwasy. Udział poszczególnych substratów w pokrywaniu zapotrzebowania energetycznego mięśni zależy od wielu czynników takich jak zaopatrzenie tlenowe, dieta, skład włókien

mięśniowych oraz rodzaj wysiłku fizycznego. Uważa się, że około 50% zapotrzebowania energetycznego mięśni w spoczynku pokrywane jest przez utlenianie kwasów tłuszczowych (Bulow 1986, Gollnick i Saltin 1988). Podczas wysiłków aerobowych o umiarkowanej intensywności (50-70% VO_2 max) wolne kwasy tłuszczowe stanowią istotne źródło energii, lecz wraz ze wzrostem intensywności wysiłku udział ich zmniejsza się a wzrasta rola węglowodanów (patrz van der Vusse i Reneman 1996). Podczas wysiłku kwasy tłuszczowe wykorzystywane przez mięśnie pochodzą z trzech źródeł - WKT związane z albuminą we krwi, kwasy tłuszczowe uwolnione z krążących lipoprotein oraz pochodzące z lipolizy wewnątrzmięśniowych TG. Rola jaką odgrywają podczas wysiłku kwasy tłuszczowe pochodzące z każdego z tych trzech źródeł nie jest do końca wyjaśniona. Uważano dość długo, że mięsień wychwytuje prawie wyłącznie kwasy tłuszczowe z osocza, natomiast te pochodzące z TG-lipoprotein czy TG wewnątrzmięśniowych niemal nie uczestniczą w tym procesie. Wyniki prac, w których stwierdzono zwiększony obrót znakowanych chylomikronów podczas wysiłku u zwierząt (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, Terjung i wsp. 1982, Terjung i wsp. 1983), wzrost aktywności LPL i obniżenie stężenia TG we krwi, obserwowane zwłaszcza po długotrwałych wysiłkach wskazują jednak na udział WKT z tych dwóch źródeł jako substratu energetycznego dla pracujących mięśni (Terjung i Kaciuba-Uściłko 1986). Podobnie udział TG wewnątrzmięśniowych w dostarczaniu WKT do szlaku β -oksydacji wydaje się bezsporny (patrz Górski 1992).

Wpływ wysiłku fizycznego na badane wskaźniki metabolizmu lipidów wydaje się szczególnie interesujący w warunkach hipo- i hipertyreozy, jako że obydwie te stany cechuje upośledzona tolerancja wysiłkowa (McAllister i wsp. 1995). Zastosowany w obecnej pracy jednorazowy wysiłek o umiarkowanej intensywności spowodował u

szczurów kontrolnych wzrost stężenia WKT we krwi oraz zmniejszenie zawartości TG w mięśniu płaszczkowatym. Nie stanowił natomiast dostatecznie silnego bodźca, który mógłby wpłynąć na aktywność żadnej z form LPL w tym mięśniu bądź na stężenie triacylogliceroli osocza. Budohoski (1985), badając zmiany aktywności obu form LPL pod wpływem wysiłku u psów stwierdził, że aktywność enzymu zależy od czasu trwania wysiłku i jego intensywności. Jest więc prawdopodobne że nawet nieznaczne wydłużenie czasu trwania biegu lub zwiększenie obciążenia wysiłkowego tych szczurów mogłoby spowodować zmianę w aktywności formy naczyniowej LPL. Nie można również pominąć faktu, że aktywność LPL w mięśniu płaszczkowatym szczurów o normalnej aktywności ruchowej jest już i tak wysoka (Hamilton i wsp. 1998), a więc umiarkowany, stosunkowo krótki wysiłek nie stanowi dla nich wystarczająco silnego bodźca. Wzrost stężenia WKT we krwi pod wpływem 30 min wysiłku u zwierząt kontrolnych wskazuje na pobudzenie lipolizy w tkance tłuszczowej głównie za pośrednictwem amin katecholowych, których stężenie zwłaszcza w początkowym okresie wysiłku wzrasta. Również powysiłkowe zmniejszenie zawartości mięśniowych TG może sugerować wpływ amin katecholowych na wzrost aktywności hormonowrażliwej lipazy w mięśniach (Langfort i wsp. 1999) tych zwierząt. Dane z piśmiennictwa dotyczące wysiłkowego wykorzystywania zasobów TG przez mięsień płaszczkowaty nie są jednoznaczne, opisywano bowiem zarówno obniżenie TG (Reitman i wsp. 1973) jak i brak zmian (Górski i Kiryluk 1980).

Powysiłkowy przebieg zmian wskaźników metabolizmu lipidów u szczurów z zaburzoną czynnością tarczycy może wskazywać na zaangażowanie odmiennych mechanizmów regulacyjnych. W spoczynku u zwierząt z niedoborem trijodotyroniny stężenie WKT w krwi było znacznie podwyższone, a TG bardzo niskie w porównaniu z grupą kontrolną. Zawartość TG w mięśniu płaszczkowatym tych zwierząt była nieco

podwyższona natomiast aktywność obu form LPL bardzo wysoka. Powysiłkowe zmiany ocenianych wskaźników w doświadczalnie wywołanej hipotyreozy były niewielkie, z wyjątkiem znacznego obniżenia aktywności zewnątrzkomórkowej formy LPL. Wydaje się, że zastosowany wysiłek nie wpłynął na dalszą mobilizację już i tak podwyższonych WKT, natomiast zmniejszona aktywność naczyniowej formy LPL mogła wynikać ze zwiększonego oddysocjowania cząsteczki enzymu od śródbłonka naczyniowego. W grupie zwierząt z nadmiarem T_3 po wysiłku obniżyła się zawartość wewnątrzmięśniowych TG, aktywność Z-LPL nie zmieniła się, natomiast zmniejszyła się aktywność formy wewnątrzkomórkowej. Taki obraz zmian sugeruje, że podczas tego typu wysiłku mięsień płaszczkowaty, który spośród mięśni szkieletowych jest najbardziej podatny na modyfikujący wpływ hormonów tarczycy, wykorzystuje głównie WKT pochodzące z hydrolizy TG wewnątrzmięśniowych jako dodatkowy substrat energetyczny. Aktywność LPL u tych szczurów jest bardzo niska. Stwierdzone powysiłkowe obniżenie aktywności formy wewnątrzkomórkowej przy niezmienionej aktywności formy zewnętrznej LPL, może wskazywać na pobudzenie mechanizmu translokacji i sekrecji enzymu z „magazynu” wewnątrzkomórkowego do światła naczyń kapilarnych w celu utrzymania stężenia TG na poziomie nie wyższym niż u zwierząt kontrolnych

Nieco odmienny charakter miały powysiłkowe zmiany aktywności LPL i zawartości TG w mięśniu sercowym badanych grup zwierząt. W grupie kontrolnej nie stwierdzono zmian w aktywności obu form LPL, wzrosła natomiast zawartość triacylogliceroli. U szczurów z niedoborem hormonów tarczycy pod wpływem wysiłku dalszemu wzrostowi uległa aktywność formy wewnątrzkomórkowej LPL, zaś aktywność formy zewnątrzkomórkowej pozostała niezmieniona. Zastosowany jednorazowy wysiłek spowodował duże zmiany określanych wskaźników metabolizmu lipidów u zwierząt z

podwyższonym poziomem trijodotyroniny we krwi. Okazało się, że aktywność obu form LPL w sercu tych zwierząt, i tak już znacząco obniżona w warunkach spoczynkowych, uległa dalszej znaczącej redukcji, co dotyczy zwłaszcza formy wewnątrzkomórkowej. Zawartość TG w mięśniu sercowym wzrosła. Ponieważ szczury z tej grupy były zdolne do wykonania 30 min wysiłku można przypuszczać, że miało u nich miejsce znaczne zwiększenie przepływu krwi przez serce i dużo szybszy obrót substratów energetycznych. Inni autorzy zaobserwowali po jednorazowych wysiłkach fizycznych zarówno brak zmian w aktywności LPL w mięśniach szkieletowych i sercu (Barakat i wsp. 1981, Kiens i wsp. 1989, Nikkila i wsp. 1963), jak i podwyższenie (Nikkila i wsp. 1965, Taskinen i wsp. 1980a) lub nawet obniżenie (Paulin i wsp. 1991) aktywności enzymu, co można wiązać z różną charakterystyką stosowanych wysiłków jak i różnorodnością warunków żywieniowych zwierząt. W obecnej pracy powyższe czynniki można wykluczyć, jako że zwierzęta wszystkich grup wykonywały taki sam wysiłek i otrzymywały taką samą dietę.

Oczekiwano, że znacznie zwiększona aktywność fizyczna zwierząt poprzez zastosowanie pięciodobowego treningu wytrzymałościowego wywoła wyraźne zmiany adaptacyjne w metabolizmie lipidowym mięśni badanych grup szczurów. Rzeczywiście u szczurów w eutyreozie stwierdzono po treningu bardzo wysoką aktywność obu form LPL w mięśniu płaszczkowatym której towarzyszył szybszy zanik znakowanych chylomikronów z krwi, zwiększony wychwyty przez ten mięsień WKT pochodzących z hydrolizy znakowanych chylomikronów oraz podwyższenie zawartości TG w porównaniu ze szczurami kontrolnymi prowadzącymi normalny tryb życia. Stężenie WKT i TG utrzymywało się natomiast na niezmiennym poziomie. Aktywność LPL w sercu trenowanych szczurów kontrolnych nie uległa zmianom, natomiast wychwyty WKT ze znakowanych chylomikronów był zwiększony w tym mięśniu,

podobnie jak zawartość TG. Taki obraz wskazuje, że wzrost aktywności LPL w mięśniach z towarzyszącymi zmianami przystosowawczymi w układzie krążenia (o czym świadczy szybszy zanik chylomikronów z krwi) oraz zwiększone wykorzystanie WKT z chylomikronów na skutek strukturalnych i czynnościowych modyfikacji są głównymi mechanizmami adaptacyjnymi po treningu, w wyniku których mięśnie pracujące mogą w większym stopniu wykorzystywać wolne kwasy tłuszczowe do resyntezy ATP. Brak zmian lub nawet obniżenie TG we krwi wynika prawdopodobnie ze zwiększonej aktywności LPL w mięśniach szkieletowych a nie tkance tłuszczowej (Borensztajn i wsp. 1975, Seip i wsp. 1995, Ong i wsp. 1995), ponieważ w tej ostatniej aktywność LPL po wysiłku jest na ogół obniżona.

Seip i wsp. (1995) w badaniach u ludzi poddanych krótkotrwałemu (5-13 dni) treningowi wykazali wzrost mRNA LPL, masy immunoreaktywnej oraz aktywności enzymu - głównie formy wewnątrzkomórkowej (nie uwalnianej przez heparynę), co może wskazywać na stymulację pre-translacyjną regulacji ekspresji LPL w mięśniach szkieletowych przez zwiększenie aktywności ruchowej. Podobny mechanizm „wysiłkowej” regulacji ekspresji LPL u szczurów postulowali Ladu i wsp. (1991a). Jak wielokrotnie podkreślano w obecnej pracy, lipaza lipoproteinowa jest enzymem, który choć syntetyzowany wewnątrz komórki aktywnie działa tylko na zewnątrz, w świetle naczyń włosowatych. W świetle tego stymulacja wewnątrzkomórkowej formy LPL przez wysiłek fizyczny wskazuje na zwiększenie „rezerwy” enzymu, która może być natychmiast dostępna dla komórki mięśniowej jeśli forma zewnątrzkomórkowa ulegnie wyczerpaniu. Wydaje się prawdopodobne, że „przepływ” enzymu od wewnątrz na zewnątrz komórki jest podczas pracy mięśniowej nasilony, choć mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze udokumentowany.

Nasuwa się pytanie w jaki sposób zwiększona aktywność fizyczna pobudza wzrost ilości mRNA LPL w mięśniach. Podejmowano próby powiązania wzrostu aktywności LPL z wysiłkowymi zmianami poziomu takich hormonów jak katecholaminy czy insulina, substratów energetycznych jak glukoza czy kwasy tłuszczowe ale być może ekspresja genu dla LPL podczas wysiłku związana jest głównie ze wzrostem siły skurczu mięśni podczas pracy (Seip i wsp. 1995)

Niezależnie od rodzaju molekularnego mediatora odpowiedzialnego za wzrost aktywności LPL podczas wysiłków wydaje się prawdopodobne, że ten sam czynnik reguluje inne geny zaangażowane w dostarczaniu substratów energetycznych do mięśni podczas wysiłku.

Interesujące wydaje się stwierdzenie w obecnej pracy, że u zwierząt z niedoborem hormonów tarczycy potreningowy obraz zmian był bardzo zbliżony do zwierząt w eutyreozy, jedynie w sercu aktywność obu form LPL uległa bardzo wyraźnemu podwyższeniu.

W przeprowadzonych badaniach grupę T₃ stanowiły szczury, poddane procesowi treningowemu w stanie eutyreozy które otrzymały iniekcje trijodotyroniny przez ostatnie 3 dni treningu. Okazało się, że ten krótkotrwały stan nadmiaru T₃ w krwi spowodował dramatyczne zmiany w metabolizmie lipidowym mięśni wytrenowanych szczurów. Wykazano bowiem, że aktywność LPL w obydwu badanych mięśniach: płaszczkowatym i sercowym uległa istotnemu obniżeniu, czemu towarzyszyło bardzo znaczne zwiększenie zawartości wewnątrzmięśniowych TG. Ze względu na to, że taki obraz zmian wystąpił u zwierząt trenowanych, u których rozwinęły się już metaboliczne zmiany przystosowawcze do wysiłku uzyskane wyniki mogą stanowić pośredni dowód na istotne znaczenie T₃ w procesie hamowania syntezy czy przyspieszenia degradacji

enzymu. Może to potwierdzać, omówioną wcześniej, rolę trijodotyroniny w syntezie cytoplazmatycznego translacyjnego czynnika represorowego. Brak piśmiennictwa na temat efektów T_3 na aktywność LPL i zawartość wewnątrzmięśniowych TG w warunkach kontrolowanej, wzmożonej aktywności ruchowej uniemożliwia przedyskutowanie wyników badań własnych z danymi innych autorów. Zwraca jednak uwagę na konieczność prowadzenia badań w tym zakresie nie tylko w warunkach podstawowych lecz również w sytuacjach gdy organizm zarówno zwierząt jak i ludzi poddawany jest działaniu bodźców fizjologicznych (np. wysiłek fizyczny) modyfikujących w znacznym stopniu szereg procesów biochemicznych na poziomie tkanek i komórek. W obecnej pracy brak jest odniesienia do badań prowadzonych u pacjentów z hiper- lub hipotyreozą. Związane jest to z istotnymi różnicami w kontroli metabolizmu mięśniowego pod wpływem hormonów tarczycy u ludzi i zwierząt doświadczalnych.

7. WNIOSKI:

1. Doświadczalnie wywołany niedobór trijodotyroniny (T_3) powoduje podwyższenie aktywności lipazy lipoproteinowej (LPL) w mięśni płaszczkowatym i sercowym szczurów, natomiast nadmiar tego hormonu hamuje aktywność LPL w obydwu mięśniach. Towarzyszy temu obniżone stężenie TG we krwi przy niedoborze T_3 a podwyższone w warunkach nadmiaru tego hormonu. Brak natomiast jednoznacznych zmian w zawartości TG w tych mięśniach.
2. Zmiany aktywności LPL wywołane nadmiarem lub niedoborem T_3 dotyczą zarówno zewnątrzkomórkowej (czynnej) jak i wewnątrzkomórkowej formy tego enzymu. Sugeruje to istotną rolę trijodotyroniny w kontroli syntezy LPL i jej transportu do naczyń włosowatych. Nie wiadomo jednak czy jest to działanie bezpośrednie, czy też efekt zmian metabolicznych towarzyszących hipo- lub hipertyreozie.
3. Zwiększenie tempa metabolizmu przez jednorazowy, krótkotrwały wysiłek nie wywiera istotnego wpływu na aktywność LPL w mięśni szkieletowym i sercowym u zwierząt z eutyreozą, natomiast pogłębia hamujący wpływ nadmiaru T_3 na aktywność tego enzymu, zwłaszcza jego formy wewnątrzkomórkowej.
4. Zarówno nadmiar jak i niedobór T_3 powodują zwiększenie szybkości usuwania TG-chylomikronów z krwi, niezależnie od odmiennego wpływu tych dwóch stanów na aktywność LPL. Hamujący wpływ T_3 na aktywność LPL w mięśniach ma więc niewielkie znaczenie w kształtowaniu tempa metabolizmu triacylogliceroli osocza.
5. Brak zależności między aktywnością LPL w mięśniach i wychwytem wolnych kwasów tłuszczowych pochodzących z TG-chylomikronów wskazuje, że potencjalna zdolność tkanki do hydrolizy TG nie jest czynnikiem determinującym miejsce do którego kierowane są uwalniane z chylomikronów kwasy tłuszczowe.

6. Trening wytrzymałościowy powoduje u zwierząt z eutyreozą i hipotyreozą zmiany adaptacyjne sprzyjające wykorzystywaniu substratów lipidowych przez mięśnie: zwiększenie aktywności obydwu form LPL w mięśniu płaszczkowatym, przyspieszenie tempa zaniku znakowanych TG chylomikronów z osocza oraz zwiększenie wychwytu pochodzących z nich kwasów tłuszczowych. Nadmiar T_3 w końcowym okresie treningu dramatycznie obniża aktywność obu form LPL w mięśniach, odwracając korzystne zmiany przystosowawcze.

8. STRESZCZENIE

Lipaza lipoproteinowa (LPL, EC 3.1.1.34) jest głównym enzymem hydrolizującym wiązania estrowe triacylogliceroli i fosfolipidów zawartych w krążących we krwi chylomikronach i VLDL-ach, udostępniając w ten sposób kwasy tłuszczowe i 2-mono-acyloglicerole do wykorzystania jako źródło energii lub materiał zapasowy otaczającym tkankom. Głównym miejscem syntezy LPL są komórki parenchymalne tkanki tłuszczowej, mięśni szkieletowych i serca skąd enzym zostaje uwolniony do śródbłonka naczyniowego. Miejscem działania enzymu jest światło naczyń włosowatych, gdzie związany jest on ze śródbłonkiem poprzez polisacharydowe łańcuchy proteoglikanów na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Z uwagi na to, że LPL jest syntetyzowana i magazynowana w komórce, a miejscem jej działania jest światło naczyń krwionośnych przyjęto podział enzymu na dwie formy: formę wewnątrzkomórkową, nieaktywną (W-LPL) i zewnątrzkomórkową, naczyniową, aktywną (Z-LPL). Aktywność LPL podlega kontroli wielu czynników fizjologicznych i patofizjologicznych, wśród których są również hormony tarczycy.

Celem obecnej pracy było: 1) określenie wpływu doświadczalnie wywołanej hipotyreozy i hipertyreozы na aktywność dwóch form lipazy lipoproteinowej w mięśniu płaszczkowatym i sercowym szczura oraz 2) określenie wpływu poziomu krążącej we krwi trijodotyroniny na stężenie TG osocza, zawartość wewnątrzmięśniowych TG, zanik TG chylomikronów z krwi oraz wychwyty uwolnionych z TG-chylomikronów kwasów tłuszczowych przez mięśnie. Ze względu na znaczny udział lipidów jako substratu energetycznego podczas pracy mięśniowej uznano również za celową ocenę wpływu jednorazowego i powtarzanego wysiłku fizycznego (treningu) na aktywność dwóch form LPL w badanych mięśniach oraz niektóre inne wskaźniki metabolizmu lipidów u szczurów z niedoborem lub nadmiarem trijodotyroniny.

Badania przeprowadzono na szczurach samcach szczepu Wistar podzielonych na trzy grupy doświadczalne: zwierzęta z eutyreozą (K), zwierzęta z usuniętą tarczycą, którym podawano dodatkowo 0,04% roztwór wodny propyltiouracylu (THY+PTU), oraz szczury, którym przez trzy dni podawano trijodotyroninę w podskórnych iniekcjach (T3). Zwierzęta z każdej grupy podzielono na trzy podgrupy: szczury o normalnej aktywności ruchowej, szczury poddane jednorazowemu, 30 min wysiłkowi fizycznemu o umiarkowanej intensywności oraz szczury poddane pięcioletniemu treningowi wytrzymałościowemu.

Przeprowadzono dwie serie doświadczeń. W pierwszej serii badań określano aktywność formy naczyniowej (Z-LPL) oraz wewnątrzkomórkowej (W-LPL) lipazy lipoproteinowej w mięśniu płaszczkowatym i sercowym, stężenie TG w surowicy krwi i mięśniach oraz poziom WKT w surowicy u zwierząt wszystkich trzech grup w spoczynku, po jednorazowym wysiłku i po treningu. W drugiej serii badań oceniano wpływ nadmiaru i niedoboru hormonów tarczycy na tempo zaniku znakowanych [^{14}C]-chylomikronów z krwiobiegu oraz wychwyty uwolnionych [^{14}C]-WKT przez mięsień płaszczkowaty i sercowy. Badania tej serii przeprowadzono u zwierząt wszystkich grup doświadczalnych w spoczynku oraz u szczurów kontrolnych i z niedoborem hormonów tarczycy po zakończeniu treningu.

U szczurów z niedoborem hormonów tarczycy stwierdzono podwyższony poziom WKT oraz znaczne obniżenie stężenia TG we krwi w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej. Taki obraz zmian tych wskaźników we krwi może wiązać się m.in. ze stwierdzonym wzrostem aktywności LPL. Aktywność formy naczyniowej i wewnątrzkomórkowej enzymu była bowiem znacznie podwyższona, zarówno w mięśniu płaszczkowatym jak i sercowym. Tempo zaniku znakowanych chylomikronów z krwi było istotnie większe w tej grupie szczurów niż u zwierząt kontrolnych, jednak wychwyty

uwolnionych w procesie hydrolizy WKT był niezmienny w mięśni płaszczkowatym i tylko nieznacznie podwyższony w mięśni sercowym. Zawartość TG wewnątrzmięśniowych była nieco podwyższona w mięśni płaszczkowatym (NS) oraz sercowym zwierząt z niedoborem T_3 , co mogło wynikać, przynajmniej w mięśni sercowym, ze zwiększonego wychwytu kwasów tłuszczowych. Nadmiar trijodotyroniny we krwi spowodował podwyższenie stężenia WKT i TG we krwi szczurów. Aktywność zarówno formy naczyniowej jak i wewnątrzkomórkowej LPL była natomiast znacząco obniżona zarówno w mięśni płaszczkowatym jak i sercowym w porównaniu z wartościami stwierdzanymi w grupie kontrolnej. Tempo zaniku ^{14}C -TG chylomikronów z krwi u szczurów z doświadczalnie wywołaną hipertyreozą było istotnie wyższe niż u zwierząt kontrolnych, jednak nieco mniejsze niż u zwierząt z niedoborem hormonów tarczycy. Nie towarzyszyły temu zmiany wychwytu WKT przez badane mięśnie. Zawartość TG tak w mięśni płaszczkowatym jak i sercowym była istotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną.

Modyfikacja zmian aktywności obu form LPL w mięśni płaszczkowatym i sercowym szczura pod wpływem niedoboru i nadmiaru trijodotyroniny we krwi wskazuje na rolę regulacyjną tego hormonu w utrzymywaniu określonego poziomu TG i WKT we krwi. Zważywszy, że obniżenie poziomu krążącej we krwi T_3 powoduje zwiększenie aktywności obydwu form LPL w mięśniach szkieletowych i sercu, a podwyższenie poziomu trijodotyroniny obniżenie aktywności obu form enzymu wydaje się prawdopodobne, że, podobnie jak wykazali Kern i wsp. (1996) w adipocytach, w cytoplazmie miocytów występuje cytoplazmatyczny czynnik represorowy dla translacji LPL, będący pod kontrolą hormonów tarczycy. Szybsze tempo zaniku znakowanych TG-chylomikronów z krwi stwierdzone w obydwu grupach doświadczalnych potwierdza sugerowany uprzednio brak współzależności między tym procesem a stanem

czynnościowym tarczycy i wskazuje na zaangażowanie innych, poza aktywnością LPL, czynników regulacyjnych. Brak bezpośredniego związku między wychwytem przez mięśnie WKT pochodzących z hydrolizy znakowanych chylomikronów a aktywnością formy naczyniowej LPL w tych mięśniach może świadczyć, że to nie potencjalne możliwości tkanki do hydrolizy TG determinują miejsce docelowe dla uwolnionych kwasów tłuszczowych.

Zastosowany jednorazowy 30-min wysiłek o umiarkowanej intensywności (ok.50% VO_2 max.) spowodował u zwierząt kontrolnych wzrost stężenia WKT we krwi i obniżenie zawartości TG w mięśniu płaszczkowatym oraz zwiększenie wewnątrzmięśniowych TG w sercu. Nie stwierdzono natomiast powysiłkowych zmian aktywności żadnej z form LPL w tej grupie zwierząt, w przeciwieństwie do szczurów ze zmodyfikowanym doświadczalnie poziomem krążących we krwi hormonów tarczycy. U szczurów z usuniętą tarczycą, następnie traktowanych PTU aktywność formy zewnątrzkomórkowej enzymu uległa obniżeniu w mięśniu płaszczkowatym, co można wiązać ze zwiększeniem oddysocjowania cząsteczek enzymu od śródbłonka naczyniowego, natomiast u szczurów z nadmiarem T_3 we krwi dalszemu zmniejszeniu uległa aktywność formy wewnątrzkomórkowej LPL oraz zawartość TG w mięśniu płaszczkowatym. Może to wskazywać na znaczniejszy udział WKT pochodzących z hydrolizy wewnątrzmięśniowych TG w pokrywaniu zwiększonego zapotrzebowania energetycznego w tym stanie. W przeciwieństwie do szczurów grupy kontrolnej jednorazowy wysiłek zmodyfikował aktywność LPL w sercu zwierząt z niedoborem T_3 , u których wzrosła aktywność formy wewnątrzkomórkowej enzymu. Przy nadmiarze trijodotyroniny we krwi powysiłkowa aktywność obu form LPL uległa dalszej redukcji. Po 5-tyg. treningu wytrzymałościowym u zwierząt kontrolnych stwierdzono wzrost aktywności obu form LPL w mięśniu szkieletowym, który wraz z szybszym zanikiem

chylomikronów z krwi oraz zwiększonym wykorzystywaniem WKT z chylomikronów wskazuje na zmiany adaptacyjne umożliwiające lepsze wykorzystywanie substratów lipidowych do resyntezy ATP. Podobny charakter potreningowych zmian ocenianych wskaźników stwierdzono u zwierząt z niedoborem hormonów tarczycy. Trzecią grupę trenującą stanowiły zwierzęta, które niemal cały proces treningowy odbywały w stanie eutyreozy a iniekcje trijodotyroniny otrzymywały przez ostatnie trzy dni cyklu treningowego. Okazało się, że ten krótkotrwały stan nadmiaru T_3 spowodował znaczące obniżenie aktywności LPL w obydwu badanych mięśniach, któremu towarzyszyło zwiększenie zawartości wewnątrzmięśniowych TG. Uzyskany wynik był zaskakujący, jako że hormon podano zwierzętom z ugruntowanymi zmianami przystosowawczymi do wysiłku. Wydaje się, że może to stanowić dowód pośredni na istotną rolę trijodotyroniny w procesie syntezy bądź degradacji lipazy lipoproteinowej.

Uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie następujących wniosków:

1. Doświadczalnie wywołany niedobór trijodotyroniny (T_3) powoduje podwyższenie aktywności lipazy lipoproteinowej (LPL) w mięśniu płaszczkowatym i sercowym szczurów, natomiast nadmiar tego hormonu hamuje aktywność LPL w obydwu mięśniach. Towarzyszy temu obniżone stężenie TG we krwi przy niedoborze T_3 a podwyższone w warunkach nadmiaru tego hormonu. Brak natomiast jednoznacznych zmian w zawartości TG w tych mięśniach.
2. Zmiany aktywności LPL wywołane nadmiarem lub niedoborem T_3 dotyczą zarówno zewnątrzkomórkowej (czynnej) jak i wewnątrzkomórkowej formy tego enzymu. Sugeruje to istotną rolę trijodotyroniny w kontroli syntezy LPL i jej transportu do naczyń włosowatych. Nie wiadomo jednak czy jest to działanie bezpośrednie, czy też efekt zmian metabolicznych towarzyszących hipo- lub hipertyreozie.

3. Zwiększenie tempa metabolizmu przez jednorazowy, krótkotrwały wysiłek nie wywiera istotnego wpływu na aktywność LPL w mięśniach szkieletowych i sercowych u zwierząt z eutyreozą, natomiast pogłębia hamujący wpływ nadmiaru T_3 na aktywność tego enzymu, zwłaszcza jego formy wewnątrzkomórkowej.
4. Zarówno nadmiar jak i niedobór T_3 powodują zwiększenie szybkości usuwania TG-chylomikronów z krwi, niezależnie od odmiennego wpływu tych dwóch stanów na aktywność LPL. Hamujący wpływ T_3 na aktywność LPL w mięśniach ma więc niewielkie znaczenie w kształtowaniu tempa metabolizmu triacylogliceroli osocza.
5. Brak zależności między aktywnością LPL w mięśniach i wychwytem wolnych kwasów tłuszczowych pochodzących z TG-chylomikronów wskazuje, że to nie potencjalne możliwości tkanki do hydrolizy TG determinują miejsce do którego kierowane są uwalniane z nich kwasy tłuszczowe.
6. Trening wytrzymałościowy powoduje u zwierząt z eutyreozą i hipotyreozą zmiany adaptacyjne sprzyjające wykorzystywaniu substratów lipidowych przez mięśnie: zwiększenie aktywności obydwu form LPL w mięśniach płaszczkowatych, przyspieszenie tempa zaniku znakowanych TG chylomikronów z osocza oraz zwiększenie wychwytu pochodzących z nich kwasów tłuszczowych. Nadmiar T_3 w końcowym okresie treningu dramatycznie obniża aktywność obu form LPL w mięśniach, odwracając korzystne zmiany przystosowawcze.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Abrams J.J., Grundy S.M.: Cholesterol metabolism in hypothyroidism and hyperthyroidism in man. *J. Lipid res.* 22, 323-338, 1981
2. Alousi A.A., Mallov S.: Effects of hyperthyroidism, epinephrine and diet on heart lipoprotein lipase activity. *Am. J. Physiol.* 206: 603-609, 1964
3. Ambroziak M., Nauman A.: Ekspresja i funkcja ludzkiej jodotyroninowej 5' dejodynazy typu I (5'DI). Regulacja ekspresji genu hdio1. *Endokrynologia Pol.* 49(3): 167-258, 1998
4. Arai M., Otsu K., MacLennan D., Alpert N., Periasamy M.: Effect of thyroid hormone on the expression of mRNA encoding sarcoplasmic reticulum proteins. *Circ Res* 69: 266, 1991
5. Ashby P., Robinson D.S.: Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose tissue lipoprotein lipase. *Biochem. J.* 188: 185-192, 1980
6. Bagby G.J., Johnson J.L., Bennett B.W., Shepherd R.E.: Muscle lipoprotein lipase in voluntary exercising rats. *J. Appl. Physiol.* 60: 1623-1627, 1986
7. Barakat H. A., Kerr D.S., Tapscott E.B., Dohm G.L.: Changes in plasma lipids and lipolytic activity during recovery from exercise of untrained rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 166: 162-166, 1981
8. Bedford, T.G., Tipton, C.H., Wilson, N.C., Oppliger, R.A., Gisolfi, C.V.: Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J. Appl. Physiol.* 47: 1278-1283, 1979
9. Beisiegel, U., Weber, W., Bengtsson-Olivecrona, G.: Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8342-8346, 1991
10. Beisiegel U., Heeren J.: Lipoprotein lipase (EC 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proceedings of the Nutrition Society* 56: 731-737, 1997
11. Benvenga S.: A thyroid hormone binding motif is evolutionarily conserved in apolipoproteins. *Thyroid* 7,4: 605-611, 1997
12. Ben-Zeev, O., Schwalb, H., Schotz, M.C.: Heparin-releasable and nonreleasable lipoprotein lipase in the perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 256, 26: 10550-10554, 1981.

13. Ben-Zeev, O., Doolittle, M.H., Davis, R.C., Elovson, J., Schotz, M.C.: Maturation of lipoprotein lipase. Expression of full catalytic activity requires glucose trimming but not translocation to the cis-golgi compartment. *J. Biol. Chem.* 267, 9: 6219-6227, 1992
14. Belfrage, P., Vaughan, M.: Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid mixture with glycerides. *J. Lipid Res.* 10: 341-344, 1969
15. Bergman E.N., Havel R.J., Wolfe B.H., Bohmer T.: Quantitative studies of the metabolism of chylomicron triglycerides and cholesterol by liver and extrahepatic tissues of sheep and dogs. *J. Clin. Invest.* 50(9): 1831-1839, 1971
16. Bergo M., Olivecrona G., Olivecrona T.: Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem. J.* 313: 893-898, 1996
17. Bilezikian J.P., Loeb J.N.: The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on α - and β -adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocr. Rev.* 4:378-388, 1983
18. Blanchette-Mackie, E.J., Masuno, H., Dwyer, N.K., Olivecrona, T., Scow, R.O.: Lipoprotein lipase in myocytes and capillary endothelium of heart: immunocytochemical study. *Am. J. Physiol.* 256: E818-E828, 1989
19. Bollman, J.L., Cain, J.C., Grindlay, J.H.: Technique for the collection of lymph from the liver, small intestine or thoracic duct of the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 33: 1349-1352, 1948
20. Borensztajn, J.: Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase. W: Lipoprotein lipase. Red. J. Borensztajn, Evener Publishers, Inc., Chicago, str 133- 148, 1987
21. Borensztajn J., Getz G.S., Padley R.J., Kotlar T.J.: The apoprotein B- independent hepatic uptake of chylomicrons remnants. *Biochem. J.* 204(2): 609-12, 1982
22. Borensztajn J., Rone M.S., Babirak S.P., MGarr J.A., Oscail L.B.: Effect of exercise on lipoprotein lipase activity in heart and skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 229: 394-397, 1975
23. Braun, J.E.A., Severson, D.L.: Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem. J.* 287, 337-347, 1992
24. Braun, J.E.A., Severson, D.L.: Lipoprotein lipase release from cardiac myocytes is increased by decavanadate but not insulin. *Am. J. Physiol.* 262: E 663-670, 1992a

25. Brent, G.A., Moore, D.D., Larsen, P.R.: Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Physiol* 53, 17 - 35, 1991
26. Brent, G.A. : The molecular basis of thyroid hormone action. *New Engl J Med.* 331,13,847-852, 1994
27. Budohoski L.: Exercise-induced changes in lipoprotein lipase activity (LPLA) in skeletal muscles of the dog. *Pflugers Arch.* 405: 188-192, 1985
28. Budohoski L., Kozłowski S., Terjung R.L., Kaciuba-Uściłko H., Nazar K., Fałęcka-Wieczorek I.: Changes in muscle lipoprotein lipase activity during exercise in dogs fed on a mixed fat-rich meal. *Pflugers Arch.* 394: 191-193, 1982
29. Bulow J.: Lipid mobilization and utilization. W: *Principles of exercise biochemistry.* Med. Sports Sci. wyd. Poortmans J.R., Basel: Karger str: 140-163, 1986
30. Burgaya, F., Peinado, J., Vilaro, S., Llobera, M., Ramirez, I.: Lipoprotein lipase activity in neonatal-rat liver cell types. *Biochem. J.* 259: 159-166, 1989
31. Camps, L., Reina, M., Llobera, M., Vilaro, S., Olivecrona, T.: Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Amer. J. Physiol.* 258: C673-C681, 1990.
32. Cappelli V., Moggio R., Polla B., Bottinelli R., Poggesi C., Reggiani C.: The dual effect of thyroid hormones on contractile properties of rat myocardium. *Pflugers Arch.* 411: 620-627, 1988
33. Carroll R., Ben-Zeev O., Doolittle M.H., Severson D.L.: Activation of lipoprotein lipase in cardiac myocytes by glycosylation requires trimming of glucose residues in the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 285: 693-696, 1992
34. Chajek-Shaul, T., Friedman, G., Ziv, E., Bar-On, H., Bengtsson-Olivecrona, G.: Fate of lipoprotein lipase taken by the rat liver. Evidence for a conformational change with loss of catalytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 963: 183-191, 1988
35. Chang, C.F., Oosts, G.M., Bensadoun, A., Rosenberg, R.D.: Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. *J.Biol. Chem.* 256, 12893-12898, 1981
36. Chappell D.A., Fry G.L., Waknitz M.A., Iverius P.H., Williams S.E., Strickland D.K.: The low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase. *J.Biol. Chem.* 267: 25764-25767, 1992
37. Cisar, L. A., Hooewerf, A.J., Cupp, M., Rapport, C.A., Bensadoun, A.: Secretion

- and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. *J. Biol. Chem.* 264, 1767-1774, 1989
38. Cryer, A.: Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int. J. Biochem.* 13: 525-541, 1981
39. Cryer A.: Lipoprotein lipase: molecular interactions of the enzyme. *Biochemical Society Transactions* 13: 27-28, 1985
40. Cryer A.: Comparative biochemistry and physiology of lipoprotein lipase. W: *Lipoprotein lipase*. Red. J. Borensztajn, Evener Publishers, Inc., Chicago, str 277-328, 1987
41. Davidson N.O., Carlos R.C., Drewek M.J., Parmer T.G.: Apolipoprotein gene expression in the rat is regulated in a tissue-specific manner by thyroid hormone. *J. Lipid Res.* 29: 1511-1522, 1988
42. DeGroot L. J.: The thyroid and its diseases rozdz. 3, str 61-111 / DeGroot L.J., Larsen P.R., Henneman G. z udziałem Kaplan E.L./ wyd. 6 Churchill Livingstone Inc. 1996
43. Deshaies Y., Geloën A., Paulin A., Marette A., Bukowiecki L.J.: Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in the rat after chronic infusion of isoproterenol. *Horm. Metab. Res.* 25: 13-16, 1993
44. Dillmann W.H.: Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am. J. Med.* 88: 626-630, 1990
45. Dolphin P., Forsyth S.J.: Nascent hepatic lipoproteins in hypothyroid rats. *J. Lipid Res.* 24:541-551, 1983
46. Doolittle M.H., Ben-Zeev, O., Elovson, J., Martin, D., Kirchgessner T.G.: The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting - evidence for posttranslational regulation. *J. Biol. Chem.* 265, 4570-4577, 1990
47. Dory L., Roheim P.S.: Rat plasma lipoproteins and apolipoproteins in experimental hypothyroidism. *J. Lipid Res.* 22:287-296, 1981
48. Eckel R.H.: Adipose tissue lipoprotein lipase. W: *Lipoprotein lipase*. Red. J. Borensztajn. Evener Publishers, Inc., Chicago, str.79-132, 1987
49. Eckel, R.H.: Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *The New England J. Med.* 320, 16: 1060-1068, 1989

50. Eggstein, M., Kuhlmann, E.: A method for the enzymatic determination of glycerol. W: *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer, H.U., ed., Acad. Press, N.Y., London, 1825-1831, 1973
51. Eisenberg S., Levy, R.I.: Lipoprotein Metabolism. *Advances in Lipid Res.* 13: 1-89, 1975
52. Eisenberg S., Sehayek E., Olivecrona T., Vlodaysky I.: Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. *J.Clin. Invest.* 90: 2013-2021, 1992
53. Enerback S., Gimble J.M.: Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *BBA* 1169: 107-125, 1993
54. Fernandez M.L., Conde A.K., Ruiz L.R., Montano C., Ebner J., McNamara D.J.: Carbohydrate type and amount alter intravascular processing and catabolism of plasma lipoproteins in guinea pigs. *Lipids* 30 (7): 619-626, 1995
55. Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.M.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J.Biol. Chem.* 226: 497-509, 1957
56. Forrest D., Sjoberg M., Vennstrom B.: Contrasting developmental and tissue-specific expression of α and β thyroid hormone receptor genes. *EMBO* 9: 1519, 1990
57. Freedman, L.P.: Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocrin Rev* 13, 129 - 145, 1992
58. Friedman G., Ben-Naim M., Halimi O., Etienne J., Stein O., Stein Y.: The expression of lipoprotein lipase activity and mRNA in mesenchymal rat heart cell cultures is modulated by bFGF. *BBA* 1082: 7-3, 1991
59. Friedman G., Chajek-Shaul T., Stein O., Noe L., Etienne J., Sten Y.: β -Adrenergic stimulation enhances translocation, processing and synthesis of lipoprotein lipase in rat heart cells. *BBA* 877: 112-120, 1986
60. Goldberg I.J.: Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J.Lipid Res.* 37: 693-707, 1996
61. Goldberg I.J., Scheraldi C.A., Yakoub L.K., Saxena U., Bisgaier C.L.: Lipoprotein apoC-II activation of lipoprotein lipase. *J.Biol. Chem.* 8: 4266-4272, 1990
62. Goldberg, I.J., Soprano, D.R., Wyatt, M.L., Vanni, T.M., Kirchgessner, T.G., Schotz, M.C.: Localization of lipoprotein lipase mRNA in selected rat tissues. *J.*

- Lipid Res. 30: 1569-1577, 1989
63. Goldman, R., Sopher, O.: Control of lipoprotein lipase secretion in mouse macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta* 1001: 120-126, 1989.
 64. Gollnick P.D., Saltin B.: Fuel for muscular exercise: role of fat. W: Exercise, nutrition and energy metabolism. Ed. Horton E.S., Terjung R.L., N.Y., Macmillian Publishing Company srt: 71-88, 1988
 65. Goodman H.M., Bray G.A.: Role of thyroid hormones in lipolysis. *Am. J. Physiol.* 210: 1053-1058, 1966
 66. Goubern M., Portet R.: Circadian rhythm and hormonal sensitivity of lipoprotein lipase activity in cold acclimated rats. *Horm. Metab. Res.* 13(2): 73-77, 1981
 67. Górski J.: Muscle triglyceride metabolism during exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 123-131, 1992
 68. Górski J., Kiryluk T.: The post-exercise recovery of triglycerides in rat tissues. *Eur. J. Appl. Physiol.* 45: 33-41, 1980
 69. Górski J., Stankiewicz-Choroszuca B.: The effect of hormones on lipoprotein lipase activity in skeletal muscle of the rat. *Horm. Metab. Res.* 14: 189-191, 1982
 70. Haddad F., Qin A.X., McCue S.A., Baldwin K.M.: Thyroid receptor plasticity in striated muscle types: effects of altered thyroid state. *Am. J. Physiol.* 274: E1018-E1026, 1998
 71. Hahn, P.F.: Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science* 98: 19-20, 1943.
 72. Hamilton M.T., Etienne J., McClure W.C., Pavey B.S., Holloway A.K.: Role of local contractile activity and muscle fiber type on LPL regulation during exercise. *Am. J. Physiol.* 275: E1016-E1022, 1998
 73. Hansson P., Nordin G., Nilsson-Ehle P.: Influence of nutritional state on lipoprotein lipase activities in the hypothyroid rat. *BBA* 753: 364-371, 1983
 74. Havel R.J.: The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J. Lipid Research* 25, 1570-1576, 1984
 75. Havel R.J.: Regulation of lipoprotein metabolism by lipoprotein receptors. W: *Atherosclerosis Reviews* vol.17 ed. R.J. Levy, Raven Press, N.Y. 1988
 76. Havel R.J., Hamilton R.L.: Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology*, 8: 1689-1704, 1988

77. Hoch F.L.: Lipids and thyroid hormones. *Prog. Lipid Res.* 27: 199-270, 1988
78. Hussain M.M., Kandia R.K., Zhon Z., Luchoomun J., Zu H., Bakillah A.:
Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *BBA* 1300(3): 151-170, 1996
79. Johnson M.A., Olmo J.L., Mastaglia F.L.: Changes in histochemical profile of rat respiratory muscles in hypo- and hyperthyroidism. *Quart. J. Expmtl. Physiol.* 68: 1-13, 1983
80. Kaciuba-Uściłko H., Dudley G.A., Terjung R.L.: Influence of thyroid status on skeletal muscle LPL activity and TG uptake. *Am. J. Physiol.* 238: E518-E523, 1980
81. Kaciuba-Uściłko H., Dudley G.A., Terjung R.L.: Muscle LPL activity, plasma and muscle triglycerides in trained thyroidectomized rats. *Horm. Metab. Res.* 13, 688-689, 1981
82. Kaciuba-Uściłko H., Greenleaf J.E., Kozłowski S.: Thyroid hormone induced changes in body temperature and metabolism during exercise in dogs. *Am. J. Physiol.* 229: 260-264, 1975
83. Keig P., Borensztajn J.: Regulation of rat heart lipoprotein lipase activity during cold exposure. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146: 890-893, 1974
84. Kern P.A., Ong J.M., Saffari B., Carty J.: The effects of weight loss on the activity and expression of adipose-tissue lipoprotein lipase in very obese humans. *N. Engl. J. Med.* 322: 1053-1059, 1990
85. Kern P.A., Ranganathan G., Yukht A., Ong J.M., Davis R.C.: Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J. Lip. Res.* 37: 2332-2340, 1996
86. Keyes W.G., Wilcox H.G., Heimberg M.: Formation of the very low density lipoprotein and metabolism of [$1-^{14}\text{C}$]oleate by perfused livers from rats treated with triiodothyronine or propylthiouracil on plasma lipoproteins in male rats. *Metabolism* 30: 135-1146, 1981
87. Kiens B., Essen-Gustavsson B., Gad P., Lithell H.: Lipoprotein lipase activity and intramuscular triglycerides stores after long-term high-fat and high-carbohydrate diets in physically trained men. *Clin. Physiol.* 7(1): 1-9, 1987
88. Kiens B., Lithell H., Mikines K.J., Richter E.A.: Effects of insulin and exercise on muscle lipoprotein lipase activity in man and its relation to insulin action. *J. Clin.*

- Invest. 84: 1124-1129, 1989
89. Kirchgessner, T.G., Svenson, K. L., Lusis, A.J., Schotz, M.C.: The sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase. *J.Biol. Chem.* 262, 18: 8463-8466, 1987
90. Kirchgessner, T.G., Chuat, J.-C., Heinzmann, C., Etienne, J., Guilhot, S., Svenson, K., Ameis, D., Pilon, C., D'Auriol, L., Andalibi, A., Schotz, M.C., Galibert, F., Lusis, A.J.: Organization of the human lipoprotein lipase gene and evaluation of the lipase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 9647-9651, 1989.
91. Klens B., Essen-Gustavsson B., Christensen N.J., Saltin B.: Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J. Physiol.* 469: 459-478, 1993
92. Korn, E.D.: Clearing factor a heparin activated lipoprotein lipase I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. *J. Biol. Chem.* 215: 1-14, 1955
93. Kotlar T.J., Borensztajn J.: Oscillatory changes in muscle lipoprotein lipase activity of fed and starved rats. *Am. J. Physiol.* 233(4): E 316-319, 1977
94. Kozłowski S., Budohoski L., Pohoska E., Nazar K.: Lipoprotein lipase activity in the skeletal muscle during physical exercise in dogs. *Pflugers Arch.* 382: 105-107, 1979
95. Kozłowski S., Nazar K.: Wprowadzenie do fizjologii klinicznej. PZWL, 1995
96. Krausz Y., Bar-On H., Shafir E.: Origin and pattern of glucocorticoid - induced hyperlipidemia in rats. Dose-dependent bimodal changes in serum lipids and lipoproteins in relation to hepatic lipogenesis and tissue lipoprotein lipase activity. *Biochim.Biophys.Acta* 663:69-82, 1981
97. Ladu M.J., Kapsas H., Palmer W.K.: Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting. *Am. J. Physiol* 260: R953-R959, 1991
98. Ladu M.J., Kapsas H., Palmer W.K.: Regulation of lipoprotein lipase in muscle and adipose tissue during exercise. *J.Appl. Physiol.* 71 (2): 404-409, 1991a
99. Langfort J., Ploug T., Ihlemann J., Saldo M., Holm C., Galbo H.: Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle. *Biochem. J.* 340: 459-465, 1999
100. Larsson L., Li X., Teresi A., Salviati G.: Effects of thyroid hormone on fast- and slow-twitch skeletal muscles in young and old rats. *J.Physiol.* 481.1: 149-161, 1994
101. Lazar, M. A.: Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities *Endocr Rev* 14: 184 -193, 1993

102. Levak-Frank S., Radner H., Walsh A., Stollberger R., Knipping G., Hoefler G., Sattler W., Weinstock P.H., Breslow J.L., Zechner R.: Muscle-specific over expression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 96(2): 976-986, 1995
103. Li X., Larsson L.: Contractility and myosin isoform compositions of skeletal muscles cells from rats treated with thyroid hormone for 0, 4 and 8 weeks. *J.Muscle Res. Cell Motil* 18 (3) : 335-344, 1997
104. Linder, C., Chernick, S.S., Fleck, T.R., Scow, R.O.: Lipoprotein lipase and uptake of chylomicron triglyceride by skeletal muscle of rats. *Am. J. Physiol.* 231: 860-864, 1976.
105. Lin-Lee Y-C, Strobl W., Soyal S., Radosavljevic M., Song M., Gotto A.M., Jr, Patsch W.: Role of thyroid hormone in the expression of apolipoprotein A-IV and C-III genes in rat liver. *J.Lipid Res.* 34: 249-259, 1993
106. Lithell H.K., Hellsing K., Lundqvist G., Malmberg: Lipoprotein lipase activity of human skeletal muscle and adipose tissue after intensive physical exercise. *Acta Physiol. Scand.* 105: 312-315, 1979
107. Lithell H., Boberg J., Hellsing K., Ljunghall S., Lundqvist G., Vessby B., Wide L. Serum lipoprotein and apolipoprotein concentrations and tissue lipoprotein lipase activity in overt and subclinical hypothyroidism: the effect of substitution therapy. *Eur. J. Clin. Invest.* 11:3-10, 1981
108. Macke-Nauman A.: Monodejodynacja tyroksyny do trijodotyroniny - specyficzność tkankowa. Regulacyjny wpływ katecholamin. *Endokrynologia Polska*, 41, 1: 1-56, 1990
109. Mackie B.G., Dudley G.A., Kaciuba-Uściłko H., Terjung R.L.: Uptake of chylomicron triglycerides by contracting skeletal muscle in rats. *J.Appl. Physiol.* 49: 851-855, 1980
110. Mallov, S., Alousi A.A.: Effect of altered cardiac metabolism and work on lipoprotein lipase activity of heart. *Amer. J. Physiol.* 212: 1158-1164, 1967
111. Mangelsdorf, D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M.: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839, 1995

112. Mason, R. L., Hunt H.M., Hurxthal L.: Blood cholesterol values in hyperthyroidism and hypothyroidism - their significance. *N.Engl. J. Med.* 203: 1273-1278, 1930
113. McAllister R.M., Delp M.D., Laughlin M.H.: Thyroid status and exercise tolerance. Cardiovascular and metabolic considerations. *Sports Med.* 20, 3: 189-198, 1995
114. Meyer B.J., Ha Y.C., Barter P.J.: Effects of experimental hypothyroidism on the distribution of lipids and lipoproteins in the plasma of rats. *B B A* 1004: 73-79, 1989
115. Michalik, A., Sznajderman, M.: *Lipidy i lipoproteiny osocza.* P.Z.W.L. 1986.
116. Miller, K.W., Small, D.M.: Structure of triglyceride-rich lipoprotein : an analysis of core and surface phases. W : *Plasma Lipoproteins*, Gotto, A.M., Jr, ed., Elsevier Science Publishers B.V., 1-71, 1987
117. Miller W.C., Osei L.B.: Relationship between type L hormone-sensitive lipase and endogenous triacylglycerol in rat heart. *Am. J. Physiol.* 247: R621-625, 1984
118. Moreno M., Lanni A., Lombardi A., Goglia F.: How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J. Physiol.* 505.2: 529-538, 1997
119. Nilsson-Ehle P., Garfinkel A.S., Schotz M.C.: Intra- and extracellular forms of lipoprotein lipase in adipose tissue. *BBA* 431: 147-156, 1976
120. Nikkila E.A.: Role of lipoprotein lipase in metabolic adaptation to exercise and training. W: *Lipoprotein lipase.* Wyd. Borensztajn J., Evener Publishers, Inc., Chicago, str: 187-199, 1987
121. Nikkila E.A., Kekki M.: Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease. *J.Clin. Invest.* 51: 2103-2113, 1972
122. Nikkila E.A., Taskinen R., Rehunen S., Harkonen M.: Lipoprotein lipase activity in adipose tissue and skeletal muscle of runners: relation to serum lipoproteins. *Metabolism* 27: 1661-1671, 1978
123. Nikkila E.A., Torsti P., Penttila O.: The effect of exercise on lipoprotein lipase activity of rat heart, adipose tissue and skeletal muscle. *Metab. Clin. Exp.* 12: 863-865, 1963
124. Nikkila E.A., Torsti P., Pentilla O.: Effects of fasting, exercise and reserpine on catecholamine content and lipoprotein lipase activity of rat heart and adipose tissues. *Life Sci.* 4: 27-335, 1965

125. O'Brien, K.D., Gordon, D., Deeb, S., Ferguson, M., Chait, A.: Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 89 : 1544-1550, 1992
126. Olivecrona T., Bengtsson-Olivecrona G.: Lipoprotein lipase from milk - the model enzyme in lipoprotein research. W: Lipoprotein lipase. Red. J. Borensztajn, Chicago, Il., Evener, str: 15-58, 1987
127. Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G., Chajek-Shaul, T., Carpentier, Y., Deckelbaum, R., Hultin, M., Peterson, J., Patsch, J., Vilaro, S.: Lipoprotein lipase. Sites of synthesis and sites of action. *Atherosclerosis Reviews* 22 : 21-25, 1991
128. Olivecrona T., Bergo M., Hultin M., Olivecrona G.: Nutritional regulation of lipoprotein lipase. *Can. J. Cardiol.* 11, suppl. G: 73G-78G, 1995
129. Olivecrona T., Hultin M., Bergo M., Olivecrona G.: Lipoprotein lipase: regulation and role in lipoprotein metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society* 56: 723-729, 1997
130. Olivecrona T., Liu G., Hultin M., Bengtsson-Olivecrona G.: Regulation of lipoprotein lipase. *Biochem. Soc. Trans.* 21,2: 509-513, 1993
131. O'Looney P.A., Vahouny G.V.: Diabetes and lipoprotein lipase activity. W: Lipoprotein lipase. Red. J. Borensztajn, Chicago, Il., Evener, str:229-246, 1987
132. Ong, J.M., Kirchgessner, T.G., Schotz, M.C., Kern P. A.: Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J.Biol. Chem.* 263, 12933-12938, 1988
133. Ong J.M., Kern P.A.: Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J.Clin.Invest.*84:305-311, 1989
134. Ong J.M., Simsolo R.B., Saffari B., Kern P.A.: The regulation of lipoprotein lipase gene expression by dexamethasone in isolated rat adiposites. *Endocrinology* 130:2310-316, 1992
135. Ong J.M., Simsolo R.B., Saghizadeh M., Pauer A., Kern P.A.: Expression of lipoprotein lipase in rat muscle: regulation by feeding and hypothyroidism. *J.Lipid Res.* 35: 1542-1551, 1994
136. Ong J.M., Simsolo R.B., Saghizadeh M., Goers J.W., Kern P.A.: Effects of exercise training and feeding on lipoprotein lipase gene expression in adipose tissue, heart,

- and skeletal muscle of the rat. *Metabolism* 44: 1596-1605, 1995
137. Oppenheimer J.H., Schwartz H.L., Strait K.A. : The molecular basis of thyroid hormone actions, str 162-184. W: Werner i Ingbar's, *The Thyroid. A fundamental and clinical text.* Wyd. 7, ed. Braverman L.E.i Utiger R.D., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
 138. Oppenheimer J.H., Schwartz H.L., Lane J.T., Thompson M.P.: Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest* 87: 125-132, 1991
 139. Packard C.J., Shepherd J., Lindsay G.M., Gaw A., Taskinen M.-R.: Thyroid replacement therapy and its influence on postheparin plasma lipases and apolipoprotein-B metabolism in hypothyroidism. *J.Clin Endocrinol Metab* 76: 1209-1216, 1993
 140. Paulin A., Deshaies Y.: Serum free fatty acids are not involved in acute exercise-induced reduction of LPL in rat tissues. *Am. J. Physiol* 262: E377-E382, 1992
 141. Paulin A., Lalonde J., Deshaies Y.: β -Adrenergic blockade and lipoprotein lipase activity in rat tissues after acute exercise. *Am. J. Physiol.* 261: R891-R897, 1991
 142. Persson, B., Bengtsson-Olivecrona, G., Enerback, S., Olivecrona, T., Jornvall, H.: Structural features of lipoprotein lipase. Lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase cofactors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. *Eur. J. Biochem.* 179 : 39-45, 1989
 143. Peters J.P., Man E.B.: The significance of serum cholesterol in thyroid disease. *J.Clin. Invest.* 29: 1-11, 1950
 144. Peterson J., Olivecrona T., Bengtsson-Olivecrona G.: Distribution of lipoprotein lipase and hepatic lipase between plasma and tissues: effect of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta* 837: 262-270, 1985
 145. Pradines-Figueres A., Barcellini-Couget S., Dani C., Vannier C., Ailhaud G.: Lipoprotein lipase stored in adipocytes and muscle cells is a cryptic enzyme. *J.Lipid Res*, 31: 1283-1291, 1990
 146. Pradines-Figueres A., Barcellini-Couget S., Dani C., Baudoin C., Ailhaud G.: Inhibition by serum components of the expression of lipoprotein lipase gene upon stimulation by growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 1118-1125, 1990a

147. Quinn, D., Shirai, K., Jackson, R.L.: Lipoprotein lipase : Mechanism of action and role in lipoprotein metabolism. *Prog. Lipid Res.* 22 : 35-78, 1982
148. Rault C., Fruchart J.C., Dewailly P., Jaillard J., Seizille G.: Experimental studies on the regulation of myocardial and adipose tissue lipoprotein lipase activities in rat. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 59: 160-166, 1974
148. Reitman J., Baldwin K.M. and Holloszy J.O.: Intramuscular triglyceride utilization by red, white, and intermediate skeletal muscle and heart during exhausting exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 628-631, 1973
149. Robinson D.S.: Lipoprotein lipase - past, present and future. W: Lipoprotein lipase. *Red. J. Borensztajn, Evener Publishers, Inc., Chicago, str 1-14, 1987*
150. Rogers M.P., Robinson D.S.: Effects of cold exposure on heart clearing factor lipase and triglyceride utilization in the rat. *J.Lipid Res.* 15(3): 263-272, 1974
151. Rohrer D., Dillmann W.T.: Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATP ase in the rat heart. *J Biol Chem* 263: 6941, 1989
152. Roncari D.A., Murphy V.K.: Effects of thyroid hormones on enzymes involved in fatty acid and glycerolipid synthesis. *J.Biol. Chem.* 250, 4134 - 4138, 1975
153. Saffari B., Ong J.M., Kern P.A.: Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by thyroid hormone in rats. *J.Lipid Res.* 33: 241-249, 1992
154. Saltin B., Gollnick P.D.: Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: *Handbook of physiology, Skeletal muscle.* Ed. Peachy L.D., Washington DC, Am. Physiol.Soc. str: 555-631, 1983
155. Saxena, U., Witte, L. D., Goldberg, I.J.: Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264 : 4349-4355, 1989.
156. Saxena, U., Goldberg, I.J.: Interaction of lipoprotein lipase with glycosaminoglycans and apolipoprotein C-II : Effects of free fatty acids. *BBA* 1043 : 161-168, 1990.
157. Saxena, U., Klein, M.G., Goldberg, I.J.: Metabolism of endothelial cell-bound lipoprotein lipase. Evidence for heparan sulphate proteoglycan-mediated internalization and recycling. *J. Biol. Chem.* 265, 22 : 12880-12886, 1990.
158. Saxena ,U., Klein, M.G., Goldberg, I.J. Identification and characterization on the

- endothelial cell surface lipoprotein lipase receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 17516-17521, 1991
159. Scow, R.O., Blanchette-Mackie, E.G.: Endothelium, the dynamic interface in cardiac lipid transport. *Molec. Cell. Biochem.* 116, 181-191, 1992
160. Scow R.O., Chernick S.S.: Role of lipoprotein lipase during lactation. W: *Lipoprotein lipase. Red. Borensztajn J.Evener Publishers, Inc., Chicago, str 149-186, 1987*
161. Seip R.L., Angelopoulos T.J., Semenkovich C.F.: Exercise induced human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. *Amer. J. Physiol.* 268: E229-E236, 1995
162. Semb, H., Olivecrona, T.: Lipoprotein lipase in guinea pig tissues : molecular size and rates of synthesis. *BBA* 878 : 330-337, 1986.
163. Semb, H., Olivecrona, T.: Mechanisms for turnover of lipoprotein lipase in guinea pig adipocytes. *BBA* 921 : 104-115, 1987.
164. Semenkovich C.F., Wism M., Noe L., Etienne J., Chan L.: Insulin regulation of lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes is mediated at postranscriptional and posttranslational level. *J.Biol. Chem.* 264(15): 9030-9038, 1989
165. Shepherd, J., Packard, C.J.: Lipid transport through the plasma metabolic basis of hyperlipidaemia. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1, 3 : 495-514, 1987.
166. Shimizu, S., Inoue, K., Tani, Y., Yamada, H.: Enzymatic microdetermination of serum free fatty acids. *Analytical Biochem.* 98: 341-345, 1979
167. Sillau A.H.: Changes in soleus muscle capillarity, oxidative capacity and fiber composition in rats recovering from hyperthyroidism. *Pflugers Arch.*404:67-72, 1985
168. Sillau A.H.: Capillarity, oxidative capacity and fibre composition of the soleus and gastrocnemius muscles of rats in hypothyroidism. *J.Physiol.* 361: 281-295, 1985a
169. Simsolo,R.B., Ong, J.M., Kern, P.A.: Charakterization of lipoprotein lipase activity, secretion, and degradation at different sites of post-translational processing in primary cultures of rat adipocytes. *J.Lipid Res.* 33, 1777-1784, 1992
170. Skottova N., Savonen R., Lookene A., Hultin M., Olivecrona G.: Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused liver. *J.Lipid Res.* 36: 1334-1344, 1995

171. Skottova N., Wallinder L., Bengtsson G.: Activity of lipoprotein lipase in thyroidectomized rats. *BBA* 750: 533-538, 1983
172. Sonne, B., Galbo, H.: Simultaneous determination of metabolic and hormonal responses, heart rate, temperature and oxygen uptake in running rats. *Acta Physiol. Scand.* 109: 201-209, 1980.
173. Soteriou, A., Cryer, A.: Purification and characterization of lipoprotein lipase from the white adipose, skeletal muscle, cardiac muscle, mammary gland and lung tissues of the rat. *Int. J. Biochem.* 25,10, 1483-1490, 1993
174. Speake B.K., Parkin S.M., Robinson D.S.: Lipoprotein lipase in the physiological system. *Biochem. Soc. Transactions* 13: 29-31, 1985
176. Surks M.I., Oppenheimer J.H.: Concentration of L-thyroxine and L-triiodo-thyronine specifically bound to nuclear receptors in rat liver and kidney : quantitative evidence favoring a major role of T3 in thyroid hormone action. *J.Clin. Invest.* 60: 508, 1977
177. Tan M.H., Sata T., Havel R.J.: The significance of lipoprotein lipase in rat skeletal muscles. *J.Lipid Res.* 18(3): 363- 370, 1977
178. Taskinen, M.-R., Nikkila, E.A., Huttunen, J.K., Hilden, H.: A micromethod for assay of lipoprotein lipase activity in needle biopsy samples of human adipose tissue and skeletal muscle. *Clinica Chimica Acta* 104: 107-117, 1980.
179. Taskinen M.-R., Nikkila E.A., Rehunen S., Gordin A.: Effect of acute vigorous exercise on lipoprotein lipase activity of adipose tissue and skeletal muscle in physically active men. *Artery* 6: 471-483, 1980a
180. Taskinen, M.-R., Kuusi, T.: Enzymes involved in triglyceride hydrolysis. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 1, 3 : 639-666, 1987.
181. Tata J.R.
Hormonal regulation of growth and protein synthesis.
Nature 219, 331-337, 1968
182. Tata J.R.: Co-ordination between membrane phospholipid synthesis and accelerated biosynthesis of cytoplasmic ribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* 116, 617-630, 1970
183. Tavangar K., Murata Y., Pedersen M.A., Goers J.F., Hoffman A.R., Kraemer F.B.: Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J.Clin. Invest.* 90: 1672-

1678,1992

184. Terjung R.L., Budohoski L., Nazar K., Kobryń A., Kaciuba-Uściłko H.: Chylomicron triglyceride metabolism in resting and exercising fed dogs. *J.Appl. Physiol.* 52: 815-820, 1982
185. Terjung R.L., Kaciuba-Uściłko H.: Lipid metabolism during exercise: influence of training. *Diabetes /Metabol. Rev.* 2: 35-51, 1986
186. Terjung R.L., B.G. Mackie, G.A. Dudley, Kaciuba-Uściłko H.: Influence of exercise on chylomicron triacylglycerol metabolism: plasma turnover and muscle uptake. *Med.Sci.Sports Exerc.* 15: 340-347, 1983
187. Torsti P.: Thyroxin and heart lipoprotein lipase. *Ann. Med. Exp. Fenn.* 43: 245-247, 1965
188. Tulloch B.R., Lewis B., Fraser T.R.: Triglyceride metabolism in thyroid disease. *Lancet* 1: 391-394, 1973
189. Wallinder, L., Bengtsson, G., Olivecrona, T.: Rapid removal to the liver of intravenously injected lipoprotein lipase. *BBA* 575 : 166-173, 1979.
190. Wallinder, L., Peterson, J., Olivecrona, T., Bengtsson-Olivecrona, G.: Hepatic and extrahepatic uptake of intravenously injected lipoprotein lipase. *BBA* 795 : 513-524, 1984
191. Wang C.S., McConnathy W.J., Kloer H.U., Alaupovic P.: Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins : effect of apolipoprotein C-III. *J.Clin. Invest.* 75: 384-390, 1985
192. Wang C.-S., Hartsuck J., McConathy W.J.: Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *BBA* 1123: 1-17, 1992
193. Wilcox H.G., Heimberg M.: Effects of hyperthyroidism on synthesis, secretion and metabolism of the VLDL apoproteins by the perfused rat liver. *BBA* 1081, 3: 246-252, 1991
194. Wilcox H.G., Keyes W.G., Hale T.A., Frank R., Morgan D.W., Heimberg M.: Effects of triiodothyronine and propylthiouracil on plasma lipoproteins in male rats. *J. Lipid Res.* 23: 1159-1166, 1982
196. Winder W.W., Holoszy J.O.: Response of mitochondria of different types of muscle to thyrotoxicosis. *Am. J. Physiol.* 232: C180-C184, 1977
197. Windler E., Havel R.J.: Inhibitory effects of C apolipoproteins from rats and

- humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J.Lipid Res.* 26: 556-565, 1985
198. Windler E.E., Greeve J., Daerr W.H., Greten H.: Binding of rat chylomicrons and their remnants to the hepatic low-density-lipoprotein receptor and its role in remnant removal. *Biochem. J.* 252: 553-561, 1988
199. Woeber K.A.: Thyrotoxicosis and the heart. *N Engl J Med.* 327: 94 -98, 1992
200. Wilson D.E., Jubiz W., Flowers C.M., Carlile S.I., Adolf A.M.: Tissue lipoprotein lipase in the hyperthyroid rat. Effect of growth and aging. *Atherosclerosis* 26: 353-362, 1977
201. Wiseman S.A., Powell J.T., Humphries S.E., Press M.: The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein receptor gene. *J. Clin Endocrinol Metabolism* 77: 108-112, 1993
202. van der Linden C.G., Simonides W.S., Muller A., van der Laarse W.J., Vermeulen J.L., Zuidwisk M.J., Moorman A.F., van Hardeveld C.: Fiber-specific regulation of Ca (2+)-ATPase isoform expression by thyroid hormone in rat skeletal muscle. *Amer J Physiol* 271 (6): C1908-C1919, 1996
203. van der Vusse G.J., Reneman R.S.: Lipid metabolism in muscle. W: *Handbook of Physiology*, section 12- Regulation and integration of multiple systems. Wyd. Rowell L.B., Sheperd, N.Y. Oxford Press, str: 952-994, 1996
204. Vannier C., Ailhaud G.: Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocyte. II. Processing, subunit assembly, and intracellular transport. *J.Biol. Chem.* 264, 13206-13216, 1989
205. Vilaro, S., Ramirez, I., Bengtsson-Olivecrona, G., Olivecrona, T., Llobera, M.: Lipoprotein lipase in liver. Release by heparin and immunocytochemical localization. *BBA* 959 : 106-117, 1988
206. Zechner R.: The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 8: 77-88, 1997