

MONIKA GÓRECKA

**METABOLIZM KWASU PALMITYNOWEGO W MIĘŚNIU
PŁASZCZKOWATYM SZCZURA IN VITRO.**

Rozprawa doktorska
wykonana
w Zakładzie Fizjologii Stosowanej
Instytutu Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Promotor:
Prof. dr hab. Hanna Kaciuba-Uściłko

Warszawa 2002

SPIS TREŚCI

1. Wykaz stosowanych skrótów	3
2. Wstęp	5
• Zasoby lipidów wewnątrzustrojowych wykorzystywane przez mięśnie szkieletowe		
• Transport kwasów tłuszczowych do wnętrza komórki		
• Udział kwasów tłuszczowych w metabolizmie komórki		
• Czynniki fizjologiczne i patologiczne wpływające na wychwytywanie i metabolizm kwasów tłuszczowych w miocytach		
3. Założenia i cele pracy	27
4. Materiał i metody	29
• Zwierzęta		
• Przebieg badań		
• Metodyka		
• Analiza statystyczna wyników		
5. Wyniki	40
• Ocena zastosowanej metody		
• Wpływ puli kwasu palmitynowego niezwiązanego z albuminą (nKP) na wychwytywanie i metabolizm kwasu palmitynowego w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym		
• Wpływ doświadczalnie wywołanego niedoboru lub nadmiaru hormonów tarczycy na profil lipidowy szczurów		
1. Stężenie KT i TG w surowicy krwi oraz zawartość TG w mięśniu płaszczkowatym u szczurów w stanie niedoboru lub nadmiaru hormonów tarczycy		
2. Wpływ niedoboru lub nadmiaru hormonów tarczycy na wychwytywanie i metabolizm kwasu palmitynowego w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym.		
6. Dyskusja	64
7. Podsumowanie i wnioski	77
8. Streszczenie	79
9. Piśmiennictwo	85

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABP	białka wiążące albuminę
ACBP	białka wiążące acyloCoA
ACC	karboksylaza acetyloCoA
ACS	syntetaza acyloCoA
ADP	adenozynodifosforan
Alb	albumina
AMP	adenozynomonofosforan
AMPK	kinaza białkowa zależna od AMP
ATP	adenozynotrifosforan
CACT	translokaza karnityno-acylokarnitynowa
cAMP	cykliczny adenzynomonofosforan
CoASH	koenzym A
CPT1	palmitoilotransferaza karnitynowa 1
CPT2	palmitoilotransferaza karnitynowa 2
CrP	fosfokreatyna
CTP	cytydynotrifosforan
DG	diacyloglicerole
DGAT	acylotransferaza diacyloglicerolowa
ECP	potencjał energetyczny komórki
ER	endoplazmatyczne retikulum
FABPc	cytoplazmatyczne białka wiążące kwasy tłuszczowe,
FABPpm	błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe
FADH₂	zredukowany dwunukleotyd flawinoadeninowy
FAT/CD36	translokaza kwasów tłuszczowych
FATP	białko transportujące kwasy tłuszczowe
GPAT	acylotransferaza glicerolo-3-fosforanowa
HSL	lipaza hormono-wrażliwa
IgG	immunoglobulina G
KP	kwasy palmitynowy
KT	kwasy tłuszczowe
LPAAT	acylotransferaza lizofosfatydowa
LPL	lipaza lipoproteinowa

MCD	dekarboksylaza malonyloCoA
MG	monoacyloglicerole
NADH	zredukowany dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy
nKP	kwasy palmitynowy niezwiązany z albuminą
nKT	kwasy tłuszczowe niezwiązane z albuminą
PDK4	kinaza dehydrogenazy pirogronianowej – izoforma 4
PL	fosfolipidy
PPH 1	fosfohydrolaza fosfatydowa 1
PTU	propyl-tiouracyl
PPAR	receptor jądrowy wiążący kwasy tłuszczowe lub ich pochodne
T₃	trijodotyronina
T₄	tetrajodotyronina, tyroksyna
TG	triacyloglicerole
UCP3	białko rozprzegające –izoforma 3
v	stosunek stężeń molarnych kwasu tłuszczowego do albuminy
VLDL	lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości

2. WSTĘP

Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (KT) spełniają wiele funkcji w organizmie. Wykorzystywane są do syntezy fosfolipidów, które są nie tylko składnikiem błon biologicznych, ale także uczestniczą w przekazywaniu informacji do komórki (np. fosforanowe pochodne fosfatydyloinozytolu). KT są również prekursorami wielu mediatorów biologicznych takich jak prostaglandyny, leukotrieny, tromboksany. Estry długołańcuchowych KT z koenzymem A (acyloCoA) uczestniczą w procesach kontroli aktywności enzymów i białek zaangażowanych w wewnątrzkomórkowym przekazywaniu informacji. Poza tym KT lub ich pochodne biorą udział w regulacji ekspresji genów. Przede wszystkim jednak KT, obok glukozy są ważnym substratem energetycznym dla wielu tkanek. Co prawda w porównaniu z glukozą utlenianie KT wymaga dostarczenia większej ilości tlenu, lecz pod względem energetycznym są one bardziej efektywne niż glukoza. Całkowite utlenienie 1 mola kwasu palmitynowego prowadzi bowiem do powstania aż 129 moli ATP, podczas gdy przez utlenienie 1 mola glukozy otrzymujemy tylko 38 moli ATP. Poza tym pula KT zmagazynowanych w organizmie w postaci triacylogliceroli (TG) przewyższa wielokrotnie zawartość zasobów węglowodanowych.

Z uwagi na to, że mięśnie szkieletowe stanowią ok. 40% całkowitej masy ciała są one jednymi z najważniejszych tkanek biorących udział w metabolizmie lipidów.

Zasoby lipidów wewnątrzustrojowych wykorzystywane przez mięśnie szkieletowe.

Mięśnie szkieletowe mogą syntetyzować *de novo* tylko bardzo niewielkie ilości KT (Saggerson i wsp. 1992). Dlatego też KT wykorzystywane przez włókna mięśniowe są dostarczane do mięśni przez przepływającą przez nie krew. Źródłem kwasów tłuszczowych we krwi jest głównie tkanka tłuszczowa, skąd są one uwalniane po hydrolizie TG przy udziale lipazy hormono-wrażliwej (HSL). Pochodzą one także z hydrolizy TG zawartych w krążących we krwi cząsteczkach chylomikronów i lipoprotein o bardzo niskiej gęstości (VLDL). Enzymem odpowiedzialnym za ten proces jest lipaza lipoproteinowa (LPL).

Regulacja aktywności LPL w tkance tłuszczowej ukierunkowana jest przede wszystkim na wychwytywanie KT przez adipocyty (Frayn i wsp. 1995, Evans i wsp. 1999, Bergo i wsp. 1996), lecz w stanie postabsorpcyjnym, a zwłaszcza po posiłkach bogato-tłuszczowych, pewna część KT uwolnionych z TG osocza zasila pulę KT krążących we krwi (Frayn i wsp. 1995, Evans i wsp. 1999), przez co staje się ona dostępna także dla innych tkanek, w tym dla mięśni szkieletowych.

Komórki tłuszczowe występują także pomiędzy włóknami mięśniowymi. Sądzone więc, że KT uwalniane przez LPL syntetyzowaną w adipocytach mięśni mogą być w tej sytuacji bezpośrednio dostępne dla komórek mięśniowych (patrz: Olivecrona i wsp. 1997). Wydaje się, że tak nie jest, ponieważ badając sieć naczyń włosowatych oplatających mięśnie szkieletowe wykazano, że w obrębie mięśni istnieją dwa odrębne systemy mikrokrażenia (patrz: Clark i wsp. 2000). Pierwszy z nich tzw. odżywczy, transportuje tlen, hormony i składniki odżywcze bezpośrednio do włókien mięśniowych. Drugi, zwany nieodżywczym dochodzi do tkanek sąsiadujących, w tym do tkanki tłuszczowej. KT uwolnione przez LPL komórek tłuszczowych, zanim staną się dostępne dla włókien mięśniowych muszą uprzednio przejść przez naczynia żyłne do ogólnego krążenia (Clerk i wsp. 2000). Tak więc wszystkie KT uwolnione z TG osocza przez LPL tkanki tłuszczowej, niezależnie od jej umiejscowienia, są albo bezpośrednio wychwytywane przez adipocyty, albo zasilają pulę KT krążących we krwi. Zatem z punktu widzenia wykorzystania KT z TG osocza przez mięśnie szkieletowe ważniejsza wydaje się być LPL syntetyzowana w miocytach.

Stwierdzono, że aktywność LPL w mięśniach szkieletowych jest podwyższona w sytuacji zwiększonego zapotrzebowania mięśni na KT (patrz: Cortright i wsp. 1997). W przeciwieństwie do tkanki tłuszczowej insulina obniża, zaś aminy katecholowe podwyższają jej aktywność. Na aktywność mięśniowej LPL wpływają także inne hormony: glikokortykoidy, hormon wzrostu, glukagon, prolaktyna oraz hormony tarczycy (Żernicka 1999, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980). Poza tym, aktywność LPL może ulec podwyższeniu w danym mięśniu na skutek jego wzmożonej aktywności skurczowej (Hamilton i wsp. 1998).

Wykorzystanie KT z lipoprotein osocza wynosi zwykle od 5 do 15% (Linder 1976) ich całkowitego wychwyty przez mięśnie. Wychwyty z tej puli KT znacznie wzrasta po posiłku (Terjung i wsp. 1982), w czasie wysiłku o umiarkowanej intensywności (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, Terjung i wsp. 1982, 1983), po treningu (Kiens i wsp. 1993), czy po zastosowaniu diety bogato-tłuszczowej (Evans i wsp. 1999, Kiens i wsp. 1987) i może wtedy osiągać wartość 50-80% całkowitego wychwyty. Obniża się natomiast przy stosowaniu diety bogato-węglowodanowej (Kiens i wsp. 1987).

Wydaje się, że obecność LPL w naczyniach włosowatych dochodzących do włókien mięśniowych nie tylko umożliwia wykorzystanie KT z TG osocza ale ma także wpływ na wychwyty KT przez miocyty. W miejscu działania LPL wzrasta lokalnie

stężenie KT we krwi przez co zwiększa się różnica stężeń KT pomiędzy komórką a osoczem, co pobudza przepływ KT do miocytów. Potwierdzają to badania Levak-Frank i wsp. (1995) z wykorzystaniem szczepów myszy z podwyższoną ekspresją LPL w mięśniach szkieletowych. Stwierdzono w nich, że mięśnie pobrane od zwierząt z podwyższoną aktywnością LPL cechowało w porównaniu do kontroli wyższe stężenie wewnątrzkomórkowych KT oraz większa ilość organelli metabolizujących KT.

Ważnym źródłem KT dla mięśni szkieletowych są też TG zmagazynowane w samych włóknach mięśniowych. Co prawda w porównaniu z tkanką tłuszczową pula TG wewnątrzmięśniowych jest niewielka, wynosi bowiem od 1 do 25 $\mu\text{mol/g}$ mokrej tkanki (patrz: Gorski 1992), ale ulega ona ciągłej odbudowie dzięki temu, że w miocytach zachodzą dwa przeciwstawne procesy: lipolizy i estryfikacji. Wykorzystanie KT z puli TG endogennych zależy od tempa hydrolizy. Wykazano, że uwalnianie KT z TG wewnątrzmięśniowych zwiększa się pod wpływem stymulacji elektrycznej mięśni (Dyck i Bonen 1998), w obecności adrenaliny lub β -agonistów (Peters i wsp. 1998, Swanton i Saggerson 1997b), w sytuacjach ograniczonej dostępności tlenu (Schoonderwoerd i wsp. 1989) oraz w mięśniach zwierząt z wywołaną cukrzycą (Saddik i Lopaschuk 1994). Natomiast pod wpływem treningu (Dyck i wsp. 2000), przy wysokich stężeniach insuliny (Dyck i wsp. 2001) czy podwyższonym stężeniu egzogennych KT (Dyck i wsp. 1997, Saddik i Loposchuk 1991, Swanton i Saggerson 1997b) tempo hydrolizy TG wewnątrzkomórkowych jest obniżone.

Stężenie KT we krwi szczura waha się w granicach 170-770 $\mu\text{mol/l}$ (Van der Vusse i wsp. 1983), a przy nasilonej lipolizie np. w czasie wysiłku o umiarkowanej intensywności znacznie wzrasta. Ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność w roztworach wodnych, KT zarówno we krwi jak i w przestrzeni pozakomórkowej tkanek są transportowane w kompleksie z albuminą. O ile stężenie KT we krwi podlega dużym wahaniom to stężenie albuminy jest raczej stałe i wynosi u szczura 0,350-0,470 mM (Wiig i wsp. 2000; Vogeli i Stoeckert 1963).

Powinowactwo albuminy do KT jest bardzo duże co powoduje, że prawie wszystkie KT są związane z albuminą, a tylko niewielka ich część (mniej niż 0,01% całkowitej puli) jest rozpuszczona w środowisku wodnym i stanowi frakcję niezwiązanych z albuminą kwasów tłuszczowych (nKT). Pojedyncza cząsteczka albuminy posiada ok. 8 miejsc wiążących KT, przy czym powinowactwo albuminy do KT zmniejsza się wraz z zapelnianiem kolejnych miejsc wiążących. Dlatego wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KT przy zachowaniu stałego stężenia albuminy czyli wraz ze wzrostem

stosunku całkowitego stężenia KT do stężenia albuminy podwyższa się pula kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą (nKT). Przebieg tych zmian ma charakter funkcji eksponencjalnej (Richieri i wsp. 1993).

O ile we krwi i w przestrzeni pozakomórkowej KT są wiązane przez albuminę, to w cytoplazmie komórki funkcję tę przejmują białka o masie 14-15 kDa, tzw. FABPc czyli cytoplazmatyczne białka wiążące kwasy tłuszczowe, mające bardzo wysokie powinowactwo do długołańcuchowych KT (patrz: Storch i Thumser 2000, Glatz i Van der Vusse 1996).

Transport kwasów tłuszczowych do wnętrza komórki

Pierwszą barierą jaką muszą pokonać KT, przechodząc z krwi do włókien mięśniowych w warunkach *in vivo* jest śródbłonek naczyń włosowatych. Po dysocjacji od albuminy KT najprawdopodobniej przemieszczają się przez śródbłonek naczyń kapilarnych, przechodząc przez zewnętrzną błonę, cytozol a następnie wewnętrzną błonę śródbłonka. Inna droga tzn. przejście KT pomiędzy komórkami śródbłonka lub boczna dyfuzja poprzez błonę fosfolipidową wydaje się być mało znacząca (patrz: Van der Vusse i wsp. 1998).

Wychwytywanie KT przez mięśnie szkieletowe jest procesem bardzo efektywnym. Podczas pojedynczego przepływu krwi przez mięśnie szkieletowe w spoczynku wychwytywane jest ok. 40% KT dostarczanych do mięśni (patrz: Van der Vusse i Reneman 1996). Kiedy badano wychwytywanie KT przez pojedyncze włókno mięśniowe, wykorzystując fluorescencyjną pochodną kwasu stearynowego, która nie jest metabolizowana w komórce, obecność KT w cytoplazmie stwierdzano już po kilkudziesięciu sekundach (Elsing i wsp. 1998).

Przez wiele lat uważano, że KT ze względu na swój hydrofobowy charakter i zdolność do łatwej rozpuszczalności w błonach fosfolipidowych wchodzą do włókien mięśniowych jedynie na zasadzie biernej dyfuzji (DeGrella i Light 1980a,b; Rose i wsp. 1990), co wynika z dużej, kilkunastokrotnej różnicy stężeń KT pomiędzy osoczem i cytoplazmą komórki (Van der Vusse i Roemen 1995, Kiens i wsp. 1999). Potwierdziły to badania, w których stwierdzano liniową zależność pomiędzy wychwytem KT przez mięsień a całkowitym stężeniem KT w środowisku. Badając jednak wychwytywanie KT przez izolowane kardiomiocyty (Sorrentino i wsp. 1988, 1989) lub mięśnie szkieletowe w perfundowanej kończynie (Turcotte i wsp. 1991) w zależności od stężenia frakcji nKT wykazano, że jest to proces wysycający się, a taki przebieg funkcji jest charakterystyczny dla procesów, w których biorą udział transportery. Pojawiła się

koncepcja, że w wychwycie KT przez włókna mięśniowe mogą być zaangażowane białka błonowe, a proces przechodzenia KT przez błonę komórkową stał się przedmiotem bardzo intensywnych badań.

Wykorzystując liposomy zbudowane z błon komórkowych mięśni szkieletowych, w których nie zachodził metabolizm KT (zawierają jedynie FABPc) potwierdzono, że transport KT przez błonę komórkową, a nie wewnątrzkomórkowy metabolizm tych kwasów, może ulegać wysyceniu wraz ze wzrostem stężenia nKT (Bonen i wsp. 1998,b). Jednocześnie odkryto w błonie komórkowej miocytów trzy białka o wysokim powinowactwie do KT. Są to: błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABPpm), translokaza kwasów tłuszczowych (FAT/CD36) oraz białka transportujące kwasy tłuszczowe (FATP) (patrz: Abumrad i wsp. 1999; Luiken i wsp. 1999a). Białko FABPpm jest zlokalizowane na zewnętrznej stronie błony komórkowej, natomiast FAT i FATP są białkami transbłonowymi. Dalsze badania wykazały, że najważniejszymi białkami biorącymi udział w wychwycie KT przez mięśnie szkieletowe i mięsień sercowy są FAT i FABPpm (Luiken i wsp. 1999b). W doświadczeniach, w których transfekowano DNA kodujące te białka w komórkach, które metabolizują KT w niewielkim stopniu (np. fibroblasty) wykazano, że każde z tych białek może zwiększać wychwytywanie KT przez komórkę (Zhou i wsp. 1992; Ibrahimi i wsp. 1996). Ważnym argumentem świadczącym o możliwości udziału białek w przechodzeniu KT przez błonę komórkową były wyniki doświadczeń z zastosowaniem: proteaz, pochodnych kwasów tłuszczowych, które nie przechodzą przez błony biologiczne oraz monoklonalnych przeciwciał. Wykazano, że wychwytywanie KT przez liposomy zbudowane z błon komórkowych mięśni szkieletowych był w 30-60% hamowany przez proteazy lub sulfo-N-bursztynioloimidylowe KT (Bonen i wsp. 1998b; Luiken i wsp. 1999b, Bonen i wsp. 2000), które nie przechodzą przez błony biologiczne i wykazują bardzo duże powinowactwo do białka FAT/CD36 (Bonen i wsp. 2000). Wykorzystując monoklonalne przeciwciała przeciwko FABPpm Turcotte i wsp. (2000) stwierdzili, że zarówno maksymalne tempo wychwytywania kwasu palmitynowego przez liposomy z błon komórkowych mięśni szkieletowych jak również wiązanie się KT z białkami w błonie komórkowej były obniżone o 75-79%. Poza tym stwierdzono, że u szczepu myszy, nie posiadających genu kodującego białko FAT/CD36 wychwytywanie kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe był obniżony o 40-75% w stosunku do wartości kontrolnych (Coburn i wsp. 2000). Van Nieuwenhoven i wsp. (1995) udowodnili ponadto na przykładzie kardiomiocytów, że zawartość FAT/CD36 w błonie komórkowej wzrasta

wraz z dojrzewaniem komórek i zwiększającym się wykorzystaniem przez nie KT. Co więcej wykazano, że zawartość białek FAT/CD36 i FABPpm w błonie komórkowej mięśni jest modyfikowane przez wiele czynników fizjologicznych i patologicznych. Wzrost zawartości białka FABPpm stwierdzano u szczurów głodzonych przez 48 godzin (Turcotte i wsp. 1997) lub poddanych treningowi fizycznemu (Turcotte i wsp. 1999). U szczurów mających ograniczone racje pokarmowe stężenie FABPpm było natomiast obniżone (Gazdag i wsp. 1998). Stężenie FAT/CD36 w błonie komórkowej mięśni podwyższało się pod wpływem stymulacji elektrycznej mięśni (Bonen i wsp. 1999, Bonen i wsp. 2000, Luiken i wsp. 2001b), chronicznej elektrostymulacji (Bonen i wsp. 1999) czy diety bogato-tłuszczowej (Greenwalt i wsp. 1995). Podwyższone stężenie FAT/CD36 stwierdzono także u szczurów z genetycznie uwarunkowaną otyłością (obese Zucker rats), wykazujących oporność mięśni na insulinę (Luiken i wsp. 2001a). W wielu zacytowanych pracach wzrost stężenia białek wiążących KT w błonie komórkowej był ściśle związany ze wzrostem wychwytu KT przez liposomy utworzone z błon komórkowych.

Hamilton (1998), który jest zwolennikiem biernej dyfuzji KT przez błonę komórkową, twierdzi że tendencja do wysycenia się wychwytu KT wraz ze wzrostem nKT nie musi odzwierciedlać procesu oddziaływania białek transportujących z KT, lecz może świadczyć o osiągnięciu równowagi fizykochemicznej pomiędzy kwasami tłuszczowymi znajdującymi się w błonie komórkowej i w kompleksie z albuminą. Autor ten sugeruje, że obniżenie wychwytu KT po zablokowaniu białek błonowych nie koniecznie wynika z dezaktywacji białek, lecz ze zmiany integralności błony. Hamilton nie wyklucza istotnej roli białek błonowych lecz uważa, że mogą one pomagać w zwiększaniu zdolności błony komórkowej do akumulacji KT, co prowadziłoby do wzrostu różnicy stężeń KT pomiędzy błoną komórkową a cytoplazmą i wspomagałoby bierną dyfuzję KT do wnętrza komórki.

Jest coraz więcej dowodów świadczących, że w wychwycie KT przez włókna mięśniowe zaangażowane są również białka FABPc (patrz: Storch i Thumser 2000, Van Nieuwenhoven i wsp. 1999, Binas i wsp. 1999).

Jak dotąd nie w pełni poznano mechanizm transportu KT przez błonę komórkową. Nie wiadomo czy poszczególne białka biorące udział w wychwycie KT działają oddzielnie, czy w sposób skoordynowany. Van Nieuwenhoven i wsp. (1999) badając w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym ekspresję genów kodujących białka FABPpm, FAT/CD36 i FABPc wykazali, że są one aktywowane jednocześnie.

W przypadku FAT/CD36 stwierdzono istnienie dwóch pul tego białka w mięśniach: jedną w błonie komórkowej, drugą w cytoplazmie komórki. Podobnie jak w przypadku transportera glukozy (GLUT-4) może następować przemieszczanie się tego białka z frakcji wewnątrzkomórkowej do błony komórkowej (Bonen i wsp. 2000, Luiken i wsp. 2002).

Obecnie coraz częściej przeważa pogląd, że KT wchodzi do komórki mięśniowej w dwojaki sposób: na zasadzie biernej dyfuzji i na zasadzie dyfuzji wspomaganej przez białka (patrz: Abumrad i wsp. 1998; Berk i Stump 1999; Coburn i wsp. 2000). Wydaje się, że udział tych dwóch mechanizmów jest zależny od stosunku stężeń KT i albuminy. Przy niskim stosunku [KT]/albumina (v) ($v \leq 3:1$), kiedy pula nKT jest niska prawdopodobnie dominuje dyfuzja ułatwiona, natomiast przy wysokim v wzrasta udział biernej dyfuzji (Berk i Stump 1999).

Udział białek w wychwycie KT przez mięśnie szkieletowe powoduje, że proces przechodzenia KT przez błonę komórkową może być istotnym mechanizmem kontroli metabolizmu KT w miocytach.

Można wysunąć hipotezę, że wchodzące do komórki KT są wiązane przez białka FABPc. Nie tylko zwiększałyby się wówczas rozpuszczalność KT ale komórka byłaby chroniona przed nadmiernym toksycznym wzrostem stężenia nKT. Wyniki badań sugerują, że białka FABPc transportują KT do miejsc ich metabolizmu w komórce mięśniowej (Schaap i wsp. 1999, Glatz i Van der Vusse 1996).

Udział kwasów tłuszczowych w metabolizmie komórki

Kwasy tłuszczowe, które weszły do komórki lub zostały uwolnione z TG wewnątrzmięśniowych są szybko estryfikowane do acyloCoA. Estryfikacja do acyloCoA jest konieczna dla aktywacji kwasu i dalszych jego przemian w komórce. Proces ten jest katalizowany przez syntetazę acyloCoA (ACS). Enzym ten występuje w wielu miejscach w komórce: na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, po zewnętrznej stronie w błonach endoplazmatycznego reticulum (ER) oraz peroksysomów. Poza tym wykazano, że białka FATP, wiążące KT w błonie komórkowej także wykazują aktywność syntetazy acyloCoA, przy czym największe jest ich powinowactwo do KT o bardzo długich łańcuchach (Coe i wsp. 1999).

Ze względu na to, że ACS występuje w komórce w różnych miejscach, nie wiadomo czy cząsteczki acyloCoA tworzą wspólną pulę dostępną dla wszystkich szlaków metabolicznych czy też każda z ACS dostarcza acyloCoA tylko dla określonych przemian. Wyniki uzyskane w badaniach na hepatocytach z zastosowaniem

inhibitora ACS sugerują, że w komórce jest raczej kilka oddzielnych pul acyloCoA (Muio i wsp. 2000).

Powstałe czasteczki acyloCoA są wiązane w cytoplazmie komórki przez białka o masie ok. 10 kDa tzw. ACBP (AcylCoA Binding Protein), mające bardzo wysokie powinowactwo tylko do średnio- i długłańcuchowych acyloCoA, natomiast nie wiążące KT (patrz: Knudsen i wsp. 1999).

Czasteczki acyloCoA ulegają szybkim przemianom. Są one utlenione do CO₂ po przejściu przez szlak β-oksydacji lub wbudowywane w TG wewnątrzmięśniowe lub fosfolipidy błonowe. Niewielka pula acyloCoA nie ulega przemianom lecz jest niezbędna w procesach regulacji aktywności enzymów oraz modyfikacji białek spełniających rolę kanałów jonowych, pomp jonowych czy translokaz (patrz: Faergeman i Knudsen 1997, Knudsen i wsp. 1999). Poza tym część KT lub ich estrów z koenzymem A jest transportowana do jądra komórkowego, gdzie po związaniu z receptorami jądrowymi PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) bierze udział w regulacji ekspresji wielu genów kodujących białka i enzymy zaangażowane w metabolizmie kwasów tłuszczowych (Gulick i wsp. 1994, Martin i wsp. 1997, Frohnert i wsp. 1999, Mascaro 1998, Van der Lee i wsp. 2000, Young i wsp. 2001).

Wbudowywanie acyloCoA w wewnątrzmięśniowe TG i PL

Początkowy etap syntezy tych dwóch typów lipidów jest wspólny. Glicerolo3-fosforan, który w mięśniach jest albo produktem pośrednim glikolizy albo powstaje w wyniku fosforylacji glicerolu przez kinazę glicerolową (Guo i Jensen 1999) jest acylowany do kwasu lizofosfatydowego. Proces ten jest katalizowany przez acylotransferazę glicerolo-3-fosforanową (GPAT). W komórce występują dwie izoformy tego enzymu, jedna w endoplazmatycznym retikulum, druga w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. W mięśniach szkieletowych aktywność mikrosomalnej GPAT stanowi ok. 85% całkowitej aktywności tego enzymu w komórce (Vila i wsp. 1990).

Kwas lizofosfatydowy jest następnie acylowany do kwasu fosfatydowego przy udziale acylotransferazy lizofosfatydowej (LPAAT). Enzym ten występuje przede wszystkim w endoplazmatycznym retikulum, chociaż np. w wątrobie niewielką aktywność LPAAT stwierdzono także w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (Coleman i wsp. 2000). Z uwagi na to, że w mitochondrium nie ma enzymów do dalszej syntezy TG i PL powstałe kwasy fosfatydowy i lizofosfatydowy są transportowane z mitochondrium do endoplazmatycznego reticulum. Na kwasie fosfatydowym kończy się też wspólny etap syntezy TG i fosfolipidów.

W syntezie TG kwas fosfatydowy jest hydrolizowany przez fosfohydrolazę fosfatydową 1 (PPH1) do diacyloglicerolu (DG). Na podstawie badań przeprowadzonych na kardiomiocytach wykazano, że pod wpływem kwasów tłuszczowych następuje przemieszczenie się PPH1 z cytoplazmy gdzie enzym jest nieaktywny do błony siateczki śródplazmatycznej (Swanton i Saggerson 1997a; Schoonderwoerd i wsp. 1990). Ostatnim etapem syntezy TG jest przyłączenie do DG jeszcze jednej cząsteczki acyloCoA przy udziale acylotransferazy diacyloglicerolowej (DGAT).

Należy dodać, że diacyloglicerol wykorzystywany do syntezy TG jest nie tylko syntetyzowany *de novo*, lecz może także pochodzić z hydrolizy TG lub rozpadu PL błonowych pod wpływem fosfolipazy C (Swanton i Saggerson 1997b, Pease i wsp. 1999, Igal i wsp. 2001a, Coleman i wsp. 2000). Poza tym pod wpływem fosfolipazy D z PL zostaje uwolniony kwas fosfatydowy, który także może być wykorzystany do syntezy TG. Wzmoczona hydroliza TG i restryfikacja KT jest charakterystyczna dla mięśni niedotlenionych (Schoonderwoerd i wsp. 1989).

W przypadku syntezy PL kwas fosfatydowy jest aktywowany przez cytydynotrifosforan (CTP). Następnie powstający cytydynodifosfodiacyloglicerol (CDP-DG) reaguje z alkoholem. W ten sposób tworzą się anionowe fosfolipidy: fosfatydyloinozytol, fosfatydyloglicerol i kardiolipina. Poza tym prekursorem fosfolipidów może być także diacyloglicerol. Wtedy to aktywowanymi składnikami są fosforanowe pochodne alkoholi (np. CDP-cholina), które następnie są przenoszone na cząsteczkę DG. W szlaku tym szlaku syntetyzowane są fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina oraz fosfatydyloseryna (Igal i wsp. 2001a,b; Coleman i wsp. 2000). Oprócz syntezy *de novo* PL podlegają w komórce przebudowie w cyklu deacylacja-reacylacja (Rubin i wsp. 1992).

Najważniejszymi fosfolipidami błony komórkowej i endoplazmatycznego reticulum w mięśniach szkieletowych są kolejno fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloinozytol i fosfatydyloseryna. Stanowią one ok. 94% wszystkich fosfolipidów (Simonides i van Hardeveld 1986; Żendzian-Piotrowska i wsp. 2000). Kardiolipina natomiast jest istotnym PL wewnętrznej błony mitochondrialnej (Paradies i wsp. 1996).

Utlenianie acyloCoA

Ze względu na to, że proces aktywacji KT zachodzi na zewnętrznej błonie mitochondrialnej, natomiast proces β -oksydacji przebiega w matriks mitochondrium

cząsteczki acyloCoA muszą wejść do mitochondrium. Jak wiadomo, wewnętrzna błona mitochondrialna jest nieprzepuszczalna dla estrów acyloCoA o długich łańcuchach węglowych, takich jak np. palmityloCoA, toteż istnieje specjalny system białek transportujący te cząsteczki do mitochondrium. Pierwszym etapem tego procesu jest przeniesienie grupy acylowej na karnitynę przy udziale palmitoilotransferazy karnitynowej1 (CPT1). Enzym ten znajduje się na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Następnie acylokarnityna jest transportowana do wnętrza mitochondrium przy udziale translokazy karnityno-acylokarnitynowej (CACT) zlokalizowanej w błonie wewnętrznej. W matriks mitochondrium grupa acylowa z acylokarnityny jest z powrotem przenoszona na CoA przez palmitoilotransferazę karnitynową 2 (CPT2) występującą po wewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej (patrz: Kerner i Hopfel 2000).

W mitochondrium cząsteczki acyloCoA ulegają β -oksydacji. Jest to proces, polegający na kilku powtarzających się reakcjach, prowadzących do rozpadu łańcucha węglowego do cząsteczek acetyloCoA. Enzymem zapoczątkującym ten proces jest dehydrogenaza acyloCoA. Cząsteczki acetyloCoA ulegają przemianom do CO_2 w cyklu Krebsa, natomiast powstałe w wyniku przemian cząsteczki NADH i FADH_2 są utleniane w łańcuchu oddechowym. W czasie tych przemian protony i elektrony przenoszone są na tlen cząsteczkowy, powstaje H_2O oraz uwalnia się energia, której znaczna część jest następnie magazynowana w postaci ATP.

Należy dodać, że pewna część kwasów tłuszczowych utleniana w mitochondriach pochodzi z hydrolizy TG wewnątrzmięśniowych. Wykazano, że KT pochodzące z hydrolizy TG wewnątrzmięśniowych są ważnym źródłem KT utlenianych w mięśniach szkieletowych o wzmożonej aktywności skurczowej (Dyck i Bonen 1998), mięśni sercowym zwierząt z doświadczalnie wywołaną cukrzycą (Saddik i Lopaschuk 1994) czy w mięśniach szkieletowych stymulowanych elektrycznie przy wysokim stężeniu KT i obniżonej dostępności glukozy (Turcotte i wsp. 1994, Hopp i Palmer 1990) oraz przy ograniczonej dostępności egzogennych KT (Dyck i wsp. 1997, Saddik i Loposchuk 1991). Udział innych lipidów wewnątrzmięśniowych: mono-, diacylogliceroli, fosfolipidów czy estrów cholesterolu w pokrywaniu zapotrzebowania energetycznego mięśnia jest natomiast niewielki (Dyck i wsp. 1997).

Kontrola utleniania kwasów tłuszczowych w mięśniach

Od dawna wiadomo było, że konieczność transportu długołańcuchowych acyloCoA do mitochondrium może być ważnym etapem ograniczającym tempo utleniania KT w mięśniach. Badania ostatnich lat wskazują, że najważniejszym procesem od którego zależy tempo transportu acyloCoA do mitochondrium jest synteza acylokarnityny katalizowana przez palmitoilotransferazę karnitynową 1 (CPT1). Stwierdzono, że aktywność CPT1 w mięśniach jest allosterycznie hamowana przez malonyloCoA (patrz: Saha i wsp. 1997, Ruderman i wsp. 1999). MalonyloCoA jest też związkiem pośrednim w procesie syntezy KT *de novo* a powstaje z acetyloCoA przy udziale karboksylazy acetyloCoA (ACC). W komórkach ssaków występują dwie izoformy tego enzymu: ACC1 i ACC2. Są to dwa różne białka kodowane przez oddzielne geny, różniące się umiejscowieniem w komórce. ACC1 jest enzymem cytoplazmatycznym, natomiast ACC2 jest związane z błoną mitochondrialną, najprawdopodobniej z błoną zewnętrzną (Abu-Elheiga i wsp. 2000). O ile w tkance tłuszczowej i w wątrobie wysoką ekspresję wykazuje izoforma ACC1 to w mięśniach szkieletowych i w sercu dominuje przede wszystkim izoforma ACC2 (Abu-Elheiga i wsp. 2000). Biorąc pod uwagę te fakty oraz to, że tempo syntezy KT w mięśniach jest stosunkowo niskie, uważa się że główną rolą wewnątrzmięśniowego malonyloCoA jest właśnie kontrola aktywności CPT1 (Saha i wsp. 1997, Ruderman i wsp. 1999, Abu-Elheiga i wsp. 2001). Stwierdzono, że zawartość malonyloCoA w komórce mięśniowej jest ściśle skorelowana z tempem utleniania KT (Merrill i wsp. 1998, Winder i Holmes 2000, Turcotte i wsp. 2002). Wraz ze wzrostem stężenia malonyloCoA w komórce zmniejsza się tempo utleniania KT w mitochondriach, natomiast obniżenie malonyloCoA prowadzi do zwiększonego utleniania KT. Obniżenie zawartości malonyloCoA w mięśniach obserwowano po wysiłku (Winder i Hardie 1996), elektrostymulacji (Saha i wsp. 2000) lub głodzeniu (McGarry i wsp. 1983), zaś podwyższenie w hyperinsulinemii lub hyperglikemii (Saha i wsp. 1999, Turcotte i wsp. 2002) a także w mięśniach odnerwionych (Saha i wsp. 1995) oraz po nakarmieniu zwierząt wcześniej poddanych głodzeniu (Chien i wsp. 2000, Saha i wsp. 1999).

Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że stężenie malonyloCoA w komórce mięśniowej podlega ścisłej kontroli. Jednym ze sposobów tej kontroli jest regulacja aktywności ACC2, polegająca na fosforylacji i defosforylacji enzymu. Fosforylacja ACC2 prowadzi do dezaktywacji enzymu i obniżenia stężenia malonyloCoA, natomiast defosforylacja aktywuje ACC2 i zwiększa stężenie malonyloCoA w komórce. Za

fosforylację ACC2 odpowiedzialna jest kinaza białkowa zależna od AMP (AMPK) (Merrill i wsp.1998, Ruderman i wsp. 1999, Saha i wsp. 2000). Zapobiega ona obniżaniu się puli ATP w komórce mięśniowej a jej aktywność wzrasta, między innymi, wraz z obniżaniem się stosunku stężeń ATP/AMP. Zwiększone wykorzystanie ATP w komórce mięśniowej prowadzi zatem do obniżenia stężenia malonyloCoA i wzrostu utleniania KT w mitochondrium. Wykazano, że aktywność AMPK zwiększa się w czasie wysiłku fizycznego lub elektrostymulacji mięśni (Hutber i wsp. 1997) a także podczas głodzenia (patrz: Hardie i Carling 1997).

W mięśniach szkieletowych występuje także dekarboksylaza malonyloCoA (MCD), enzym, który katalizuje proces hydrolizy malonyloCoA z powrotem do acetyloCoA (Saha i wsp. 2000, Alm i Saggerson 1998). Wydaje się, że MCD może również wpływać na stężenie malonyloCoA w miocytach. Jednak badania nad regulacją aktywności tego enzymu w mięśniach szkieletowych nie dały jednoznacznych wyników. Dane uzyskane przez Saha i wsp. (2000) sugerowały, że aktywność MCD podobnie jak aktywność ACC2 jest regulowana przez AMPK, przyczym fosforylacja MCD prowadzi do aktywacji enzymu. Hipotezy tej nie potwierdziły jednak badania Kaushik i wsp. (2001) oraz Habinowski'ej i wsp. (2001), w których nie stwierdzono wpływu AMPK na aktywność MCD w mięśniach szkieletowych.

Stężenie malonyloCoA zależy ponadto od zawartości cytrynianu w cytoplazmie. Pełni on dwie role: jest substratem dla acetyloCoA a jednocześnie allosterycznie zwiększa aktywność ACC2 (Saha i wsp. 1997). Wzrost stężenia cytrynianu w cytoplazmie zwiększa stężenie malonyloCoA w komórce mięśniowej. Badania Saha i wsp. (1997) oraz Sidossis i wsp. (1996) wykazały, że wzrost stężenia cytrynianu jest ściśle związany ze zwiększoną dostępnością glukozy i jej utlenianiem w mięśniach. Mamy więc do czynienia z sytuacją przeciwną do opisywanej przez Randle'a (1964), który twierdził, że zwiększone utlenianie KT w komórce mięśniowej, poprzez podwyższone stężenie cytrynianu w cytoplazmie, hamuje utlenianie glukozy. Zwiększone stężenie cytrynianu jest najprawdopodobniej główną przyczyną podwyższenia malonyloCoA w mięśniach szkieletowych w hiperinsulinemii lub/i hiperglikemii (Winder i Holmes 2000).

Z doświadczeń na zwierzętach nakarmionych po okresie głodzenia wynika, że nie są to jednak wszystkie możliwe mechanizmy regulacji stężenia malonyloCoA w komórce mięśniowej. Jak wykazały badania Chien i wsp. (2000) oraz Sahy i wsp. (1999) wzrost malonyloCoA obserwowany po nakarmieniu nie jest związany ani ze

zmienioną aktywnością ACC2 i MCD, wynikającą z fosforylacji/defosforylacji enzymu, ani z podwyższonym stężeniem cytrynianu w cytoplazmie. Autorzy tych prac sugerują, że jest to spowodowane prawdopodobnie obniżoną dostępnością długołańcuchowych cząsteczek acyloCoA w komórce, o których wiadomo że mogą allosterycznie hamować aktywność ACC2 (Alm i Saggerson 1998, Saha i wsp. 1997, Trumble i wsp. 1995).

Na tempo utleniania KT w mitochondrium oprócz stężenia malonyloCoA wpływa także stosunek stężeń acylokarnityny i acyloCoA. Wykazano, że tempo utleniania KT przez mięśnie zwiększa się przy podwyższonym stosunku [acylokarnityna]/[acyloCoA], zaś przy obniżonym stosunku ulega zmniejszeniu (Alm i Saggerson 1998).

Zwiększona dostępność kwasów tłuszczowych i podwyższone tempo procesu β -oksydacji KT może prowadzić do wzrostu stosunków stężeń acetyloCoA/CoA oraz NADH/NAD⁺ w mitochondrium. To z kolei stymuluje w mięśniach szkieletowych aktywność kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (zwłaszcza 4 izoformy tego enzymu- PDK4), która jest odpowiedzialna za fosforylację i dezaktywację kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (patrz: Sugden i wsp. 2001, Sugden i Holness 1994). Kompleks ten katalizuje przemianę pirogronianu do acetyloCoA. Zahamowanie aktywności dehydrogenazy pirogronianowej prowadzi do zmniejszonego utleniania glukozy w mitochondriach i tym samym może dodatkowo zwiększać udział kwasów tłuszczowych w procesach oksydacyjnych. Jak wynika z piśmiennictwa podwyższoną aktywność PDK4 w mięśniach szkieletowych szczura stwierdza się przy zastosowaniu diety bogato-tłuszczowej (Holness i wsp. 2000), w czasie głodu (Peters i wsp. 2001, Sugden i wsp. 2000b) czy w doświadczalnie wywołanej cukrzycy (Wu i wsp. 1999), a więc w sytuacjach zwiększonej dostępności KT.

Ibrahimi i wsp. (1999), wykorzystując szczep myszy ze zwiększoną ekspresją białka FAT/CD36 udowodnili, że tempo utlenianie KT w sytuacji dużego zapotrzebowania na energię, może być ograniczone przez transport kwasów tłuszczowych przez błonę komórkową. Poza tym, tempo oksydacji KT zależy może również od dostępności KT i O₂ we krwi, stężenia białek wiążących KT i acyloCoA w cytoplazmie, aktywności syntetazy acyloCoA, oraz enzymów zaangażowanych w procesach β -oksydacji (np. dehydrogenazy β -hydroksyacyloCoA) i cyklu Krebsa (np. syntetazy cytrynianowej) czy w łańcuchu oddechowym (np. cytochrom c).

Kontrola syntezy lipidów w mięśniach

O ile stosunkowo dobrze poznano poszczególne etapy biosyntezy TG i PL oraz enzymy katalizujące te przemiany we włóknach mięśniowych to niewiele jeszcze dotychczas wiadomo o mechanizmach kontroli tych procesów.

Powszechnie przyjęło się uważać, że tempo estryfikacji KT w mięśniach szkieletowych zależy od dostępności glicerolo-3-fosforanu i acyloCoA w komórce. Potwierdzają to między innymi badania Coburn i wsp. (2000), którzy stwierdzili istotne zmniejszenie tempa wbudowywania KT w kwas lizofosfatydowy, fosfatydowy, TG i PL prowadzące do akumulacji KT w DG w wyniku ograniczonego wychwytu KT, spowodowanego brakiem białka FAT/CD36 w błonie komórkowej.

Dane dotyczące aktywności enzymów biorących udział w procesach syntezy TG i PL pochodzą przede wszystkim z badań nad metabolizmem lipidów w tkance tłuszczowej, wątrobie i sercu. Wynika z nich, że najważniejszym enzymem, od którego zależy tempo estryfikacji KT do TG i PL jest GPAT (patrz: Coleman i wsp. 2000, Cortright i wsp. 1997, Dircks i Sul 1997).

Wykazano, że na aktywność GPAT w tych tkankach wpływa przede wszystkim insulina. Stwierdzono, że w adipocytach i hepatocytach hormon ten zwiększa aktywność mitochondrialnej frakcji GPAT, a w mniejszym stopniu aktywność mikrosomalnej GPAT (patrz: Coleman 2000), podczas gdy w kardiomiocytach stymuluje jedynie mitochondrialną GPAT (patrz: Cortright i wsp. 1997). W tkance tłuszczowej również hormony tarczycy odgrywają rolę w regulacji aktywności enzymów biorących udział w syntezie TG. Przy niedoborze hormonów tarczycy opisywano w tej tkance wzrost aktywności mikrosomalnej GPAT z towarzyszącym obniżeniem aktywności mitochondrialnej GPAT (Baht i Saggerson 1988).

W izolowanych komórkach mięśnia sercowego wykazano, że adrenalina zwiększa tempo syntezy TG i PL, co jest związane z 40% wzrostem aktywności mikrosomalnej GPAT, bez zmian aktywności GPAT mitochondrialnej (Swanton i Saggerson 1997b). Heathers i wsp. (1985), wykorzystując model izolowanego perfundowanego serca, stwierdzili obniżoną aktywność mikrosomalnej GPAT pod wpływem adrenaliny.

Nieliczne badania udziału GPAT w regulacji syntezy TG i PL we włóknach mięśniowych dotyczą wpływu insuliny na aktywność tego enzymu. Wykorzystując miocyty linii BC3H-1 wykazano, że w przeciwieństwie do kardiomiocytów insulina podwyższała aktywność mikrosomalnej GPAT (Vila i wsp. 1990).

Muoio i wsp. (1999a), badając tempo estryfikacji KT w komórkach wątroby stwierdzili, że AMPK, która zwiększa tempo utleniania KT w tej tkance wpływa jednocześnie na wbudowywanie KT do TG wewnątrzkomórkowych, obniżając tempo tego procesu. Wykazano, że jest to związane z zahamowaniem aktywności mitochondrialnej GPAT. Ci sami badacze wykazali podobny wpływ AMPK na utlenianie i estryfikację KT w mięśni szkieletowym, lecz w odróżnieniu od wątroby nie obserwowali zmian w aktywności mitochondrialnej GPAT w miocytach, co według nich wynika przede wszystkim z niskiej aktywności tego enzymu we włóknach mięśniowych.

Badania nad metabolizmem KT w mięśni sercowym wykazały ponadto, że acylokarnityna - produkt CPT1 może wpływać hamująco na aktywność GPAT (Hulsmann i wsp. 1982).

Obok GPAT, ważnym enzymem z punktu widzenia syntezy TG wydaje się być także acylotransferaza diacyloglicerolowa (DGAT), lecz niewiele jest danych dotyczących regulacji aktywności tego enzymu w komórkach ssaków (patrz: Coleman i wsp. 2000, Farese i wsp. 2000). Schoonderwoerd i wsp. (1990) wykorzystując izolowany mięsień sercowy wykazali, że aktywność DGAT może ulegać zwiększeniu pod wpływem kwasów tłuszczowych.

W dostępnej literaturze nie znaleziono danych na temat kontroli syntezy PL we włóknach mięśniowych. Z badań przeprowadzonych na hepatocytach, fibroblastach i oocytach wynika, że estryfikacja KT do PL zależy od dostępności cytydynotrifosforanu w komórce (patrz: Coleman i wsp. 2000). Poza tym wydaje się, że synteza PL jest związana z procesem przebudowy błon i proliferacją komórki.

Na przykładzie fibroblastów i oocytów wykazano, że przy bardzo niskiej zawartości KT w mieszaninie inkubacyjnej (3-30 μM) są one przede wszystkim wbudowywane w PL, natomiast kiedy stężenie KT jest wysokie (100-300 μM) przeważa proces syntezy TG (Igal i wsp. 2001b, Rosenthal 1981). Wydaje się, że enzymem odpowiedzialnym za rozdzielenie acyloCoA pomiędzy szlak syntezy TG i PL może być mitochondrialna GPAT. Igal i wsp. (2001b), badając tempo wbudowywania kwasu oleinowego we frakcje TG i PL w oocytach z podwyższoną ekspresją genu kodującego mitochondrialną GPAT stwierdzili, że niezależnie od stężenia tego kwasu w mieszaninie inkubacyjnej był on preferencyjnie wbudowywany w pulę TG.

Regulacja lipolizy w mięśniach szkieletowych

O ile dobrze poznano mechanizmy regulacji lipolizy w tkance tłuszczowej, to kontrola hydrolizy wewnątrzmięśniowych TG budzi jeszcze wiele niejasności.

Mięśnie szkieletowe zawierają trzy rodzaje lipaz różniących się pH optymalnym dla ich aktywności, a mianowicie lipazę lizosomalną (pH = 5), lipazę lipoproteinową (pH = 8,5) i lipazę neutralną (pH = 7). Przez wiele lat sądzono, że lipaza lipoproteinowa jest odpowiedzialna za hydrolizę TG w komórce mięśniowej. Z tego powodu poszukiwano w różnych warunkach bezpośredniej zależności pomiędzy aktywnością LPL a zawartością TG w mięśniach (Oscari 1990), chociaż wiadomym było, że środowisko wewnątrzkomórkowe w mięśniu nie jest optymalne dla LPL a poza tym brak jest w miocytach apoproteiny C II, niezbędnej do aktywacji tego enzymu.

Zainteresowano się zatem lipazą neutralną z uwagi na to, że lipaza HSL obecna w tkance tłuszczowej jest właśnie lipazą neutralną (patrz: Straalfors i wsp. 1987). Rzeczywiście wykorzystując przeciwciała przeciwko HSL z tkanki tłuszczowej wykryto w mięśniowych szkieletowych szczura białko (Holm i wsp. 1987), którego optymalne warunki działania są takie same jak HSL w adipocytach (Langfort 1999). Okazało się, że lipaza obecna w mięśniach, podobnie jak HSL tkanki tłuszczowej katalizuje proces hydrolizy TG do monoacylogliceroli i kwasów tłuszczowych, przy czym jej aktywność katalityczna jest znacznie wyższa w stosunku do diacylogliceroli jako substratu niż w stosunku do triacylogliceroli. Badania cytowanych autorów dowodzą zatem, że za hydrolizę wewnątrzkomórkowych TG w mięśniach szkieletowych, podobnie jak w tkance tłuszczowej odpowiedzialna jest lipaza hormonowrażliwa.

Dotychczas niewiele jest danych na temat regulacji aktywności HSL w mięśniach szkieletowych. Langfort i wsp. (1999) udowodnili, że podobnie jak w adipocytach aktywność tego enzymu jest stymulowana przez adrenalinę, która działając poprzez receptory typu β i cAMP zwiększa aktywność kinazy białkowej A, odpowiedzialnej za fosforylację enzymu. Ta sama grupa badaczy wykazała ponadto, że zwiększona aktywność mięśnia w czasie skurczu może również aktywować HSL (Langfort i wsp. 2000), przy czym w procesie tym uczestniczy kinaza białkowa C (Donsmark i wsp. 2002). Envoldsen i wsp. (2001) stwierdzili natomiast, że trening fizyczny, który hamuje hydrolizę wewnątrzmięśniowych TG, zmniejsza wrażliwość lipazy triacyloglicerolowej na stymulujące działanie adrenaliny.

Wydaje się, że HSL nie jest jedynym enzymem, który może hydrolizować TG wewnątrzkomórkowe. Haemmerle i wsp. (2002) stwierdzili bowiem, że u myszy, które nie syntetyzowały białka HSL wzrasta znacznie akumulacja diacylogliceroli (DG) w tkance tłuszczowej, mięśniach szkieletowych i sercu, natomiast tempo hydrolizy TG do DG albo nie uległo zmianie w mięśniach szkieletowych i sercu, albo było nieznacznie obniżone (tkanka tłuszczowa). Według autorów tej pracy za hydrolizę wewnątrzkomórkowych TG w tych warunkach mogłaby być odpowiedzialna neutralna hydrolaza estrów cholesterolu, która wykazuje aktywność także w stosunku do TG.

Czynniki fizjologiczne i patologiczne wpływające na wychwytywanie i metabolizm kwasów tłuszczowych w miocytach

Wychwytywanie i wykorzystanie KT przez mięśnie szkieletowe zależą od bardzo wielu czynników między innymi od: stężenia kwasów tłuszczowych we krwi, rodzaju włókien mięśniowych, aktywności skurczowej mięśnia, stanu nasycenia organizmu (głód vs. nakarmienie) oraz rodzaju stosowanej diety. Na metabolizm KT w mięśniach może też wpływać szereg hormonów np.: insulina, aminy katecholowe, leptyna czy hormony tarczycy, lecz mechanizmy ich działania są wciąż jeszcze słabo poznane.

Według klasyfikacji Armstrong'a i Phelps'a (1995) u szczura wyróżnia się trzy rodzaje włókien mięśniowych, które różnią się cechami morfologicznymi i biochemicznymi: włókna typu I wolnokurczące się (ST) oksydacyjne i włókna typu II szybko kurczące się, które z kolei dzielone są zwykle na dwie podgrupy IIa (FTR) czyli włókna szybko kurczące się tlenowo-glikolityczne, czerwone oraz IIb (FTW) - włókna szybko kurczące się glikolityczne, białe

Włókna typu I i IIa, w porównaniu do włókien IIb, zawierają więcej mitochondriów, cechuje je większa aktywność enzymów związanych z tlenowymi przemianami energetycznymi i wyższe stężenie mioglobiny. Oprócz wyższego potencjału oksydacyjnego włókna te charakteryzuje znacznie wyższa aktywność LPL (Hamilton i wsp. 1998, Ladu i wsp. 1991b, Linder i wsp. 1976), większa zawartość białek wiążących KT: FABPm i FAT w błonie komórkowej (Turcotte i wsp. 1997; Bonen i wsp. 1998b; Luiken i wsp. 1999b; Bonen i wsp. 1997), FABPc w cytoplazmie (patrz: Glatz i Van der Vusse 1996) oraz białek wiążących cząsteczki acyloCoA (ACBP). Poza tym zawierają one więcej TG i cechuje je bardziej nasilona ekspresja lipazy hormono-wrażliwej (Langfort i wsp. 1999, Peters i wsp. 1998), większa liczba receptorów typu β (Williams i wsp. 1984) i gęstsza sieć naczyń włosowatych. Ponadto CPT1 znajdująca się w błonie mitochondrialnej tych włókien jest znacznie mniej

wrażliwa na hamujące działanie malonyloCoA niż analogiczny enzym we włóknach glikolitycznych (Kim i wsp. 2002). Z kolei włókna typu I w porównaniu do włókien IIa mają niższą aktywność enzymów przemian glikolitycznych, odbudowa ATP odbywa się w nich przede wszystkim poprzez fosforylację oksydacyjną.

W mięśniach o przewadze włókien typu I, do których należy mięsień płaszczkowaty wykorzystanie kwasów tłuszczowych jest największe (Dyck i wsp. 1997, Budohoski i wsp. 1996).

Jest dobrze udokumentowane, że wychwytywanie i metabolizm KT przez mięśnie szkieletowe wzrasta wraz ze wzrostem aktywności skurczowej mięśnia wywołanej przez wysiłek fizyczny lub stymulację elektryczną.

Zwiększona aktywność skurczowa mięśnia prowadzi do wzmożonej hydrolizy ATP i wzrostu stężenia AMP w komórce. Obniżenie stężenia ATP przy wzroście stężenia AMP pobudza aktywność kinazy białkowej zależnej od AMP (AMPK). Wykazano, że aktywność AMPK zwiększa się w czasie wysiłku fizycznego lub elektrostymulacji mięśni (Hutber i wsp. 1997), która fosforylując karboksylazę acetyloCoA (ACC) hamuje jej aktywność i obniża stężenie malonyloCoA w komórce (Winder i Hardie 1996, Saha i wsp. 1995). Obniżone stężenie malonyloCoA powoduje, że zwiększa się aktywność CPT1 i transport acyloCoA do mitochondrium. Poza tym AMPK zmniejsza aktywność mitochondrialnej GPAT przez co dodatkowo zwiększa transport acyloCoA do mitochondrium i tempo jego utleniania (Muoio i wsp. 1999a).

Podczas wysiłku zwiększa się stężenie amin katecholowych w osoczu krwi. Aminy katecholowe nie tylko zwiększają uwalnianie KT z tkanki tłuszczowej i stężenie KT we krwi, ale mają także bezpośredni wpływ na mięśnie szkieletowe. Pod wpływem amin katecholowych wzrasta przepływ krwi przez pracujący mięsień (Hagstrom-Toft i wsp. 1998), co zwiększa zarówno dostępność KT jak i TG osocza. Poza tym w pracujących mięśniach pod wpływem amin katecholowych i zwiększonej aktywności skurczowej wzrasta aktywność LPL (Ladu i wsp. 1991a). Większa dostępność TG osocza i podwyższona aktywność LPL doprowadzi prawdopodobnie do dodatkowego lokalnego wzrostu stężenia KT we krwi pracujących mięśni. Wzrost stężenia KT we krwi przy w miarę stałym stężeniu albuminy powoduje, że wzrasta w surowicy także puli KT niezwiązanych z albuminą (nKT). Nasilone utlenianie acyloCoA w komórce doprowadza zaś do zmniejszenia stężenia acyloCoA i KT w komórce (Kiens i wsp. 1999). Równoczesny wzrost stężenia KT we krwi i obniżone stężenie KT w komórce zwiększa różnicę stężeń KT pomiędzy komórką a osoczem co prawdopodobnie

prowadzi do wzrostu ich biernego transportu do miocytu. Poza tym wykazano, że zwiększony wychwyty KT przez pracujące mięśnie wiąże się również ze wzrostem stężenia FAT/CD36 w błonie komórkowej (Bonen i wsp. 1999, Bonen i wsp. 2000). Stwierdzono, że pod wpływem stymulacji elektrycznej mięśnia następuje przemieszczanie się białka FAT/CD36 z cytoplazmy do błony komórkowej (Bonen i wsp. 2000).

Aminy katecholowe oraz aktywność skurczowa mięśnia stymulują również aktywność HSL we włóknach mięśniowych (Langfort i wsp. 1999, 2000), tym samym zwiększa się dostępność KT endogennych.

Dyck i Bonen (1998), wyznakowując pulę TG wewnątrzmięśniowych *in vitro* wykazali, że podczas wzmożonej aktywności skurczowej mięśnia wzrasta zarówno tempo utleniania KT egzogennych jak i endogennych. Ci sami autorzy, określając udział tych dwóch pul w całkowitym utlenianiu KT przez izolowany mięsień stwierdzili natomiast, że o ile w spoczynku z utleniania KT endogennych pochodzi tylko 10% niezbędnej energii a resztę pokrywają KT egzogenne, to w pracującym mięśniu jego zapotrzebowanie energetyczne jest w 90% pokrywane przez KT endogenne, zaś z utleniania egzogennych KT pochodzi tylko 10% ATP.

W kurczącym się mięśniu, oprócz wzmożonego tempa utleniania KT dochodzi także do nasilenia procesu wbudowywania KT w TG (Dyck i Bonen 1998). Ze względu jednak na to, że tempo utleniania KT wzrasta aż 4-8 krotnie, a tempo syntezy TG tylko o 33-68% zmienia się udział procentowy tych procesów w komórce. O ile w spoczynku utleniane jest bezpośrednio 25% KT wchodzących do komórki mięśniowej, zaś pozostałe 75% jest estryfikowane, w tym ok. 50% jest wbudowywane w TG, to podczas elektrostymulacji proces utleniania stanowi 70% a estryfikacji ok. 30%. Nie stwierdzono, wpływu wysiłku na tempo wbudowywania KT w inne frakcje lipidowe, takie jak PL, DG lub MG (Dyck i Bonen 1998).

Nie wiadomo czy zwiększone tempo estryfikacji KT do TG wynika tylko ze zwiększonej dostępności KT i glicerolo-3-fosforanu i czy też istnieją jeszcze inne mechanizmy kontroli tego procesu. Badając wpływ adrenaliny na metabolizm KT w mięśniu sercowym stwierdzono, że hormon ten oprócz stymulacji lipolizy TG wewnątrzmięśniowych zwiększa również tempo syntezy TG *de novo*, tzn. od acylacji glicerolo-3-fosforanu (Swanton i Saggerson 1997b).

Jeżeli tempo hydrolizy TG wewnątrzmięśniowych przewyższa znacznie tempo estryfikacji KT to dochodzi do obniżenia zawartości TG w pracującym mięśniu, co jest

bardzo częstym zjawiskiem podczas wysiłku o umiarkowanej intensywności lub w czasie elektrostymulacji (Hopp i Palmer 1990, Hurley i wsp. 1986, Dyck i Bonen 1998).

Dobrze znane jest antylipolityczne działanie insuliny na uwalnianie KT z tkanki tłuszczowej. Przybywa ponadto dowodów na to, że insulina reguluje także wychwyty i metabolizm KT w mięśniach szkieletowych. Stwierdzono, że pod wpływem wysokich dawek tego hormonu zwiększa się wychwyty KT przez mięśnie (Dyck i wsp. 2001, Turcotte i wsp. 2002), co najprawdopodobniej jest związane ze wzrostem stężenia białek FABPm (Turcotte i wsp. 2001) i FAT/CD36 (Dyck i wsp. 2001, Luiken i wsp. 2002). Jak wykazali Luiken i wsp. (2002) pod wpływem insuliny następuje przemieszczenie białka FAT/CD36 z cytoplazmy do błony komórkowej.

Wchodzące do włókien mięśniowych KT są pod wpływem insuliny przede wszystkim estryfikowane do TG (Muoio i wsp. 1997, Muoio i wsp. 1999b, Dyck i wsp. 2001, Luiken i wsp. 2002) i PL (Luiken i wsp. 2002). Tempo utleniania KT do CO₂ albo pozostaje bez zmian (Turcotte i wsp. 2001), albo ulega obniżeniu (Turcotte i wsp. 2002, Dyck i wsp. 2001, Muoio i wsp. 1999b, Muoio i wsp. 1997, Sidossis i wsp. 1996). Obniżone tempo utleniania KT pod wpływem tego hormonu związane jest z podwyższeniem tempa utleniania glukozy w mitochondriach, które prowadzi do wzrostu stężenia cytrynianu a w następnej kolejności do podwyższenia stężenia malonyloCoA (Saha i wsp. 1999). O tym ostatnim związku wiadomo, że allosterycznie hamuje aktywność CPT1 i uniemożliwia transport acyloCoA do mitochondrium. Zwiększone pod wpływem insuliny tempo estryfikacji KT do TG może być spowodowane zwiększonym transportem KT do komórki lub wiązać się z lepszą dostępnością glicerolo-3-fosforanu pochodzącego z glukozy (Boggs i Buse 1995, Chen i wsp. 1994). Poza tym wykazano, że insulina zwiększa aktywność mikrosomalnej GPAT w miocytach BC3H-1 (Vila i wsp. 1990).

Podwyższonemu tempu wbudowywania KT do TG towarzyszy obniżone tempo hydrolizy wewnątrzmięśniowych TG (Dyck i wsp. 2001), prowadzące do znacznego podwyższenia tej puli KT w mięśniach szkieletowych (Turcotte i wsp. 2002). Jest to charakterystyczne dla cukrzycy insulino-niezależnej (patrz: Goodpastre i Kelley 1998).

Wpływ hormonów tarczycy na metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych jest prawie całkiem nieznanym. Lepiej natomiast poznano udział tych hormonów w kontroli metabolizmu KT w wątrobie, tkance tłuszczowej i sercu (patrz: Hoch 1988, Yen 2001). Badając te tkanki wykazano, że trijodotyronina (T₃) – aktywny

hormon tarczycy wpływa na tempo lipogenezy i ketogenezy (Castellani i wsp. 1991), tempo lipolizy zapasowych TG (Oppenheimer i wsp. 1991), przemianę glicerolo-3-fosforanu do TG i PL (Roncari i Murthy 1977, Baht i Saggerson 1988) oraz tempo utleniania KT do CO₂ (Stakkestad i Bremer 1982, Heimberg i wsp. 1985, Paradies i wsp. 1996, Sugden i wsp. 1999).

W tkance tłuszczowej szczura w stanie hipertyreozy obniża się tempa wbudowywania glicerolo-3-fosforanu w TG, natomiast przy niedoborze hormonów tarczycy stwierdzano zwiększenie się tempa tego procesu. Badając wpływ hormonów tarczycy na procesy estryfikacji i oksydacji KT w wątrobie wykazano, że ich nadmiar we krwi obniża tempo wbudowywania KT w TG a zwiększa tempo utleniania KT do CO₂, podczas gdy hipotyreoza wywołuje efekt przeciwny. W sercu nadmiar hormonów tarczycy stymuluje zarówno tempo syntezy TG jak i tempo utleniania KT w mitochondriach. W stanie hipotyreozy obserwowano zaś znaczne zmniejszenie zdolności oksydacyjnej mięśnia sercowego. Wykazano, że obserwowane zmiany tempa estryfikacji i oksydacji KT w wyżej wymienionych tkankach wynikają z wpływu T₃ na aktywność enzymów zaangażowanych w tych procesa - między innymi GPAT (Stakkestad i Bremer 1982, Dang i wsp. 1985), CPT1 (Jensen i wsp. 2000, Sugden i wsp. 1999) i CACT (Paradies i wsp. 1996) oraz na biosyntezę fosfolipidów wewnętrznej błony mitochondrialnej (Paradies i wsp. 1997a,b).

Trijodotyronina powoduje liczne zmiany czynnościowe, biochemiczne i histochemiczne w mięśniach szkieletowych. Dobrze znany jest wpływ stanu czynnościowego tarczycy na kurczliwość mięśni szkieletowych (Fitts i wsp. 1980, Lomax i Robertson 1992, Jakubiec-Puka 1999), wewnątrzmięśniowy metabolizm glukozy (Dubaniewicz i wsp. 1989, Dimitriadis i wsp. 1997) czy potencjał oksydacyjny mięśnia (Baldwin i wsp. 1980, De Luise i Harker 1989).

Wrażliwość mięśni szkieletowych na działanie T₃ jest różna w zależności od typu włókien mięśniowych. Wykazano, że mięsień o przewadze włókien oksydacyjnych, np. mięsień płaszczkowaty jest bardziej wrażliwy na działanie T₃ niż mięśnie o przewadze włókien oksydacyjno-glikolitycznych lub glikolitycznych (Winder i Holloszy 1977, Capo i Sillau 1983).

Od dawna wiadomo, że hormony tarczycy, zwłaszcza T₃ wpływają na ilość mitochondriów oraz aktywność enzymów mitochondrialnych: syntetazy cytrynianowej, oksydazy cytochromu c, dehydrogenazy α -glicerolofosforanowej, dehydrogenazy bursztynianowej, czy poziom cytochromu c (Tata i wsp. 1963, Baldwin i wsp. 1980,

Terjung i Koerner 1976, McAllister i wsp. 1995). Wzrost aktywności tych enzymów lub białek prowadzi do zwiększonego pobierania tlenu przez mięśnie oraz zwiększonej produkcji ATP co jest charakterystyczne dla nadczynności tarczycy (Short i wsp. 2001).

Niewiele jest danych na temat wpływu stanu czynnościowego tarczycy na przemiany lipidów w mięśniach szkieletowych i mechanizmy biorące udział w ich kontroli. W stanie doświadczalnie wywołanej niedoczynności tarczycy u szczurów stwierdzano zwiększoną aktywność LPL w mięśniach szkieletowych. (Żernicka 1999, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980), natomiast przy nadmiarze hormonów tarczycy we krwi obniżoną aktywność tego enzymu (Żernicka 1999, Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980). Wykazano także, że stan czynnościowy tarczycy wpływa na zawartość wewnątrzmięśniowych TG. Niedobór hormonów tarczycy obniża (Kaciuba-Uściłko 1980) bądź nie zmienia (Żernicka 1999) zawartości TG wewnątrzmięśniowych. Natomiast pod wpływem nadmiaru T_3 stężenie TG w mięśniach szkieletowych wzrasta (Żernicka 1999, Kaciuba-Uściłko 1980). Poza tym wykazano, że stan czynnościowy tarczycy ma wpływ na tempo metabolizmu PL oraz skład fosfolipidów w błonie komórkowej, i mitochondrialnej oraz błonach retikulum endoplazmatycznego mięśni szkieletowych (Żendzian-Piotrowska 2000, Simonides i wsp. 1987).

3. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Wychwytywanie, utlenianie i wbudowywanie KT w lipidy wewnątrzmięśniowe przez mięśnie szkieletowe można badać *in vivo*, *in situ* i *in vitro*. W modelu *in vivo* podaje się w iniekcji dożylniej znakowany kwas tłuszczowy, a następnie na podstawie piętna izotopowego w wydychanym CO₂ i w poszczególnych frakcjach lipidowych wyekstrahowanych z mięśnia określa się tempo utleniania KT i syntezy lipidów. Metoda *in vivo* wymaga stosowania dużych dawek znakowanego kwasu tłuszczowego, ponieważ znaczna jego ilość jest wychwytywana przez wątrobę. Ponadto ze względu na hydrolizę TG przez LPL w naczyniach kapilarnych włókien mięśniowych trudno jest określić faktyczne stężenie KT dostępnych bezpośrednio dla miocytów. Dlatego do badań nad wychwytem i metabolizmem KT w mięśniach szkieletowych szczura w obecnej pracy wybrano model *in vitro*, stosowany dotychczas w naszym Zakładzie w badaniach nad metabolizmem glukozy w mięśniach szkieletowych szczura (Budohoski i wsp. 1993, 1987, 1984; Dubaniewicz i wsp. 1989; Langfort i wsp. 1993, 1991).

Do badań wybrano mięsień płaszczkowaty (soleus) z uwagi na to, że jest to mięsień płaski o niewielkiej masie, co pozwala na uniknięcie problemów z prawidłową dyfuzją tlenu do jego wnętrza (Bonen i wsp. 1994). Mięsień płaszczkowaty składa się przede wszystkim z włókien oksydacyjnych (ok. 69%) oraz oksydacyjno-glikolitycznych (ok. 31%) (Dyck i wsp. 1997) i wychwytuje znacznie więcej KT niż inne niewielkie mięśnie szczura wykorzystywane w modelach *in vitro* (Dyck i wsp. 1997).

W warunkach *in vivo* z uwagi na stałe stężenie albuminy we krwi, wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KT w osoczu wzrasta jednocześnie wielkość kompleksu KT-albumina oraz stężenie kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą (nKT). Ze względu na to, że nie ma jak dotąd pewności czy i w jakim stopniu frakcja nKT odgrywa rolę w wychwycie KT przez mięśnie szkieletowe, postanowiono wykorzystując model *in vitro* zbadać jak zmienia się wychwytywanie oraz utlenianie kwasu palmitynowego (KP) i tempem jego wbudowywania się w TG i PL wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KT przy zachowaniu stałej puli nKT w medium inkubacyjnym.

Głównymi celami obecnej pracy było:

1. Sprawdzenie czy zastosowana metoda *in vitro* może umożliwić prawidłową ocenę wychwytywania kwasu palmitynowego (KP) przez mięsień płaszczkowaty szczura oraz prześledzenie losów tego kwasu w komórkach mięśniowych poprzez określenie

tempa utleniania KP do CO₂ oraz tempa wbudowywania tego kwasu w pule acylogliceroli i fosfolipidów.

2. Określenie udziału frakcji kwasów tłuszczowych związanych i niezwiązanych z albuminą na wychwyty KP przez mięsień płaszczkowaty, tempo jego utleniania do CO₂ oraz wbudowywania w lipidy wewnątrzmięśniowe.
3. Z uwagi na istotną, a słabo poznaną rolę hormonów tarczycy w kontroli metabolizmu lipidów w mięśniach szkieletowych postanowiono także zbadać czy u szczurów z doświadczalnie wywołanym stanem niedoboru lub nadmiaru T₃ tempo wychwyty KP przez izolowany mięsień płaszczkowaty oraz tempo jego metabolizmu w komórce ulegają zmianom.

4. MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta

Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Wistar o masie ciała 160-180 g. Zwierzęta trzymane w klatkach po 10 sztuk, w pomieszczeniu o kontrolowanej temperaturze $20 \pm 2^\circ\text{C}$ i 12 godzinnym okresie światła i ciemności. Szczury karmiono standardową, granulowaną paszę produkowaną przez Zakład Wytworni Pasz w Motyczy przy Centralnym Laboratorium Paszowym w Lublinie oraz podawano wodę do picia *ad libitum*.

Na 17-19 godzin przed rozpoczęciem doświadczeń wszystkie zwierzęta były pozbawiane pokarmu, miały natomiast swobodny dostęp do wody. W każdej serii doświadczalnej zwierzęta usypiano pentobarbitem sodu (preparat Vetbutal, Biowet, Puławy) w dawce 60 mg/kg masy ciała i pobierano od nich mięsień płaszczkowy (soleus) z obydwu kończyn, a w niektórych seriach doświadczalnych zwierzęta dekapitowano i pobierano krew.

Przebieg badań

Do określenia wychwytu i metabolizmu kwasów tłuszczowych w inkubowanym mięśniu płaszczkowym wykorzystywano kwas palmitynowy (KP), ponieważ jest to jeden z KT powszechnie występujących we krwi szczura (ok. 32% całkowitej puli KT we krwi) (Górski i wsp. 1998). Ponadto, zawartość KP w lipidach jest w mięśniu płaszczkowym u szczura także wysoka, od 18 do 32% całkowitej zawartości KT w danej frakcji (Górski i wsp. 1998).

Wykonano 3 główne serie doświadczalne.

A. Celem **pierwszej serii badań** było dopracowanie metody umożliwiającej pomiar tempa wychwytu kwasu palmitynowego (KP) przez inkubowany mięsień płaszczkowy oraz prześledzenie przemian (losów) tego kwasu wewnątrz mięśnia.

- 1) Oceniono żywotność inkubowanego mięśnia oznaczając w nim stężenie nukleotydów adenylowych: ATP, ADP, AMP oraz fosfokreatyny (CrP) przed rozpoczęciem i po 30 min inkubacji.
- 2) Sprawdzone metodą jakościową czy kwas palmitynowy związany z cząsteczką albuminy dyfunduje do wnętrza inkubowanego mięśnia.
- 3) Zbadano jak zmienia się wychwyty KP znakowanego węglem C^{14} przez inkubowany mięsień płaszczkowy wraz z czasem trwania inkubacji oraz określono wielkość jego utleniania i wbudowywania do puli lipidów wewnątrzmięśniowych.

4) Oceniono zależności pomiędzy całkowitym stężeniem kwasu palmitynowego w mieszaninie inkubacyjnej a tempem wychwytu i wykorzystania tego kwasu przez mięsień płaszczkowy.

B. W **drugiej serii badań**, stosując opracowany model doświadczalny, zbadano czy i w jakim stopniu tempo wychwytu KP i jego metabolizm w mięśniu płaszczkowym zależą od puli tego kwasu niezwiązanego z albuminą (nKP). W tym celu mięśnie płaszczkowe pobrane od szczurów inkubowano w roztworach o wzrastającym całkowitym stężeniu KP przy jednocześnie wzrastającym, bądź stałym stężeniu frakcji nKP.

C. W **trzeciej serii doświadczeń** podjęto próbę oceny zależności tempa wychwytu i wykorzystania KT przez mięsień płaszczkowy *in vitro* od stężenia hormonów tarczycy we krwi.

Badaniami tej serii objęto trzy grupy zwierząt:

- 1) szczury kontrolne (**K**), o normalnej czynności tarczycy;
- 2) szczury z niedoborem hormonów tarczycy (**THY+PTU**) wywołanym operacyjnym usunięciem tarczycy a następnie podawaniem w wodzie do picia 0,04% roztworu propyltiouracylu (6-n-Propyl-2-Thiouracyl - PTU, Sigma) przez 5 tygodni;
- 3) szczury o podwyższonym poziomie trijodotyroniny we krwi (**T3**) wywołanym podawaniem tego hormonu w dawce 75 μg T₃/100 g m.c. (sól sodowa L-trijodotyroniny, Glaxo Laboratories LTD, Anglia) przez 3 kolejne dni w iniekcjach dootrzewnowych.

We wcześniejszych badaniach prowadzonych w naszym Zakładzie (Dubaniewicz i wsp. 1989) stwierdzono, że trzydniowe podawanie szczurom trijodotyroniny (T₃) w wyżej wymienionej dawce powoduje ok. 9-krotne podwyższenie stężenia tego hormonu we krwi z jednoczesnym ok. 2-krotnym obniżeniem poziomu tyroksyny (T₄) we krwi (Tab. 1). W grupie szczurów z doświadczalnie wywołaną hypotyreozą wykazano natomiast obniżenie stężenia zarówno T₃ jak i T₄ odpowiednio o około 3 i 2 razy (Tab. 1)

Poza tym u szczurów z grupy **T3** stwierdzono obniżenie masy ciała o 10-15%, co jest charakterystyczne dla krótkotrwałej suplementacji T₃ (Dimitriadis 1997; Thompson i wsp. 1993; Żernicka 1999). U zwierząt z usuniętą tarczycą obserwowano również zahamowanie wzrostu i wyraźne zmniejszenie masy ciała. Jest to bardzo częste zjawisko u szczurów z doświadczalnie wywołanym niedoborem hormonów tarczycy (Moreno i wsp. 1997; Żernicka 1999).

W celu scharakteryzowania profilu lipidowego wszystkich badanych grup zwierząt oznaczano stężenie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (KT) i triacylogliceroli (TG) w surowicy krwi oraz zawartość TG w mięśni płaszczkowatym.

TABELA 1

Stężenie trijodotyroniny (T₃) i tyroksyny (T₄) w surowicy krwi szczurów kontrolnych (K), z doświadczalnie wywołanym nadmiarem (T3) lub niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU).

Grupy	Stężenie hormonów (ng/ml)	
	T ₃	T ₄
K	1,48 ± 0,15 (n= 40)	62.40 ± 2.41 (n= 40)
THY+PTU	0,55 ± 0,04 (n= 29)	39,79 ± 2,50 (n= 29)
T3	12,70 ± 2,57 (n= 27)	31,42 ± 1,71 (n= 31)

Według Dubaniewicz i wsp. (1989).

Metodyka

Przygotowanie wodnego roztworu kwasu palmitynowego

Ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność kwasów tłuszczowych w środowisku wodnym, do doświadczeń przygotowywano kompleks kwasu palmitynowego z albuminą (Borgstrom i Olivecrona 1961). W tym celu 1 mmol kwasu palmitynowego (B.D.H., Anglia) przeprowadzano w sól sodową poprzez zmydlenie 1 N roztworem NaOH w stosunku molowym 1 : 1,5 w obecności 96% alkoholu etylowego w temp. 37 °C. Następnie roztwór ten odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temp. 50°C. Do powstałego osadu palmitynianu sodu dodawano 5% roztwór albuminy bydlęcej wolnej od kwasów tłuszczowych (Sigma A 7511) w roztworze soli fizjologicznej o pH= 7,4 i rozpuszczano w temp. 60 °C, ciągle mieszając. Otrzymany 5 mM roztwór kwasu palmitynowego przechowywano w temp. -20°C i przed każdym doświadczeniem rozcieńczano buforem Krebsa-Ringera dożądanego stężenia.

Izolacja mięśnia płaszczkowatego

Mięsień płaszczkowaty pobrany od szczurów w narkozie izolowano wraz ze ścięgnami zgodnie z opisem Crettaza i wsp (1980). Natychmiast po wypreparowaniu mięsień dzielono wzdłuż włókien na dwie połowy o masie ok. 25-35 mg. Każdą

połówkę mięśnia podwiązywano za ścięgna do stalowych klamerek, aby nadać im spoczynkowe naprężenie. Tak przygotowaną próbkę mięśnia przenoszono natychmiast do roztworu inkubacyjnego.

Przebieg inkubacji mięśnia

W celu zregenerowania mięśnia każdą jego próbkę poddawano 15 min. pre-inkubacji w 5 ml buforu Krebsa-Ringera o pH= 7,4 zmodyfikowanego przez Challiss'a i wsp. (1983) oraz Budohoskiego i wsp. (1984), a zawierającego 0,221 mM albuminy z krwi bydlęcej wolnej od kwasów tłuszczowych i 5,5 mM glukozy. Następnie próbki mięśni przenoszono na 10, 20 lub 30 min. do 5 ml właściwego buforu inkubacyjnego. Zawierał on dodatkowo "zimny" kwas palmitynowy (KP) w stężeniu 0,5; 1,0 lub 1,5 mM oraz [1-¹⁴C]-kwas palmitynowy o aktywności 0,6 μ Ci/ ml (NEN, NEC-075, Niemcy) Stosunek stężeń molarnych kwasu palmitynowego i albuminy ($v = [KP]/[Alb]$) w przygotowywanych roztworach wzrastał wraz ze wzrostem stężenia KP i wynosił 2,3; 4,5 oraz 6,8 odpowiednio przy 0,5; 1,0 oraz 1,5 mM KP.

W doświadczeniach mających na celu zbadanie udziału puli kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą na wychwyty i wykorzystanie tego kwasu przez mięsień część próbek mięśni ($n = 28$) inkubowano w roztworach o wzrastającym stężeniu zarówno KP (0,5 ; 1,0 ; 1,5 mM) jak i albuminy (0,147 ; 0,294 ; 0,442 mM) tak aby zachować stałą wartość v równą 3,4. Kontrolne mięśnie ($n = 24$) inkubowano natomiast w sposób opisany wyżej, czyli przy wzrastającym v .

Zarówno pre-inkubację jak i inkubację właściwą prowadzono w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temp. 37 °C, nasycając roztwory inkubacyjne mieszaniną O₂/CO₂ (95:5 v/v). Po zakończeniu inkubacji próbki mięśni płukano w roztworze soli fizjologicznej, osuszano i zamrażano w ciekłym azocie.

Na podstawie pomiaru radioaktywności oznaczano w mięśniu wychwyty kwasu palmitynowego, jego utlenianie do CO₂ i wbudowywanie w pule lipidów wewnątrzmięśniowych. Radioaktywność mierzono zawsze w liczniku scyntylicyjnym (LKB Wallac, Finlandia), stosując roztwór scyntylicyjny o składzie: toluen 1500 ml, triton X -100 750 ml, PPO 6g, POPOP 0,15 g. Odczytywano ilość impulsów przypadającą na minutę pomiaru (cpm).

Ze względu na to, że utlenianie KT z puli endogennej jest odwrotnie proporcjonalne do stężenia KT dostarczanych do mięśnia płaszczkowego z zewnątrz (Dyck i wsp. 1997), aby wykorzystanie KT z puli endogennej było jak najmniejsze, do mieszaniny

inkubacyjnej dodawano duże ilości KT (0,5-1,5 mM), ale nie przekraczające wartości spotykanych w warunkach *in vivo*.

Pomiar utleniania kwasu palmitynowego przez mięsień

Natychmiast po zakończeniu inkubacji wytworzony CO₂ uwalniano zakwaszając roztwór inkubacyjny 0,3 ml 50 % roztworu HClO₄ (Leighton i wsp. 1985). Dwutlenek węgla zbierano na bibułę filtracyjną nasączoną 0,2 ml 10 % roztworu NaOH przez 1 godz. w temp. 20-25 °C (Christiansen i wsp. 1976). Bibułę z zaabsorbowanym ¹⁴CO₂ przenoszono następnie do fiolki scyntylacyjnej zawierającej 10 ml scyntylatora i mierzono jej radioaktywność. Tempo utleniania obliczano wg. wzoru [1] i wyrażano w nmolach KP/min./g mokrej tkanki.

$$[1] \text{ Tempo utleniania KP} = \frac{\text{radioaktywność CO}_2 / A_1}{\text{masa mięśnia} \times \text{czas inkubacji}}$$

A₁ - Radioaktywność buforu inkubacyjnego = ilość impulsów (cpm) / nmol KP

Ekstrakcja lipidów wewnątrzmięśniowych i ich rozdział na podstawowe frakcje

Lipidy całkowite ekstrahowano z inkubowanego mięśnia mieszaniną chloroformu i metanolu w stosunku 2:1 (v/v) (Folch i wsp. 1957). Skrawki mięśnia w całości przenoszono do 1 ml tej mieszaniny. Ekstrakcję prowadzono przez 24 godz. w temp. 20-25 °C w szczelnie zamkniętych probówkach.

W doświadczeniach wstępnych stwierdzono, że z tak przeprowadzonej ekstrakcji lipidów, z mięśnia odzyskuje się ok. 95% całkowitej radioaktywności ¹⁴C. Wykazano ponadto, że homogenizacja tkanki przed ekstrakcją nie wpływa istotnie na uzyskane wyniki. Tempo wbudowywania KP w TG wewnątrzmięśniowe, w mięśniu ekstrahowanym w całości wynosiło średnio 3,3 ± 0,43 nmole /min./g mokrej tkanki (n = 4) a z mięśnia zhomogenizowanego przed ekstrakcją 2,9 ± 0,35 nmole/min./g mokrej tkanki (n = 4).

Z uzyskanego ekstraktu pobierano próbkę (0,3 ml) i rozdzielano na podstawowe frakcje lipidowe mono-, di- (MG/DG), triacylogliceroli (TG), fosfolipidów (PL) i kwasów tłuszczowych (KT), wykorzystując technikę chromatografii cienkowarstwowej.

W tym celu ekstrakt odparowywano do sucha w strumieniu azotu, rozpuszczano w 50 µl mieszaniny Folcha i наносono na płytkę chromatograficzną (Silica Gel 60 F 254, Merck, art. 5554) o wymiarach 13 x 1,3 cm w odległości 1 cm od jednego z końców płytki. Tak przygotowaną płytkę rozwijano w komorze chromatograficznej zawierającej heptan - eter etylowy - kwas octowy (40:20:1 v/v/v) (Mangold 1969). Po wysuszeniu płytki w temp. 20-25 °C identyfikowano poszczególne frakcje lipidowe w oparach jodu, stosując jako wzorzec oryginalne standardy (mono-, di- i triacylogliceroli). Wartości współczynnika refrakcji (Rf) identyfikowanych frakcji lipidowych były następujące: triacyloglicerole 0,55; kwasy tłuszczowe 0,26; diacyloglicerole 0,14 - 0,15; fosfolipidy 0,01. Następnie fragment płytki z daną frakcją lipidową wycinano i przenoszono do fiolki scyntylicyjnej zawierającej 1 ml metanolu i pozostawiano na 2 godz. w temperaturze pokojowej, następnie dodawano do fiolki mieszaninę scyntylicyjną i mierzono radioaktywność każdej frakcji. Wyjątek stanowiły frakcje mono- i diacylogliceroli, których radioaktywność mierzono w jednej fiole. Straty radioaktywności ekstraktu związane z zastosowaną techniką jego rozdzielania wynosiły średnio $10 \pm 4\%$ (n = 91), co zostało uwzględnione w obliczeniach. Wielkość tempa wbudowywania KP w pule mono-, diacylogliceroli i triacylogliceroli oraz fosfolipidów obliczano korzystając ze wzoru [2].

$$[2] \text{ Tempo wbudowywania KP w lipidy wewnątrzmięśniowe} = \frac{[(R \text{ danej frakcji} \times 1,11) \times 3,33] / A_1}{\text{masa mięśnia} \times \text{czas inkubacji}}$$

A_1 - Radioaktywność buforu inkubacyjnego = ilość impulsów (cpm)/ nmol KP

W celu określenia jaka część wyekstrahowanego kwasu palmitynowego pochodzi bezpośrednio z komórek mięśnia płaszczkowatego, a jaka z przestrzeni pozakomórkowej, w dodatkowych doświadczeniach dokonywano pomiaru objętości przestrzeni pozakomórkowej (co zostanie opisane w dalszej części tego rozdziału). Stwierdzono, że prawie cały KP obecny w ekstrakcie lipidowym inkubowanego mięśnia pochodzi z przestrzeni pozakomórkowej a stężenie wewnątrzkomórkowego KP jest bliskie zeru.

Określenie całkowitego wychwyty kwasu palmitynowego przez mięsień

Porcję ekstraktu (0,3 ml) przenoszono bezpośrednio do fiolki scyntylicyjnej i po odparowaniu do sucha w strumieniu azotu dodawano scyntylicyjną, mierzono radioaktywność, a następnie obliczano całkowitą radioaktywność mięśnia. Ze względu

na to, że kwas tłuszczowy obecny w ekstrakcie lipidowym pochodził z przestrzeni pozakomórkowej mięśnia od radioaktywności całkowitej mięśnia odejmowano wartość radioaktywności frakcji kwasów tłuszczowych i obliczano tempo wychwytu KP stosując wzór [3].

$$[3] \text{ Tempo wychwytu KP} = \frac{[(R_{cm} + R_{CO_2}) - R_{cKT}]/A_1}{\text{masa mięśnia} \times \text{czas inkubacji}}$$

R_{cm} - Radioaktywność całkowita ekstraktu z mięśnia

R_{CO_2} - Radioaktywność CO_2

R_{cKT} - Radioaktywność całkowita frakcji kwasów tłuszczowych

A_1 - Radioaktywność buforu inkubacyjnego = ilość impulsów (cpm) / nmol KP

Pomiar objętości przestrzeni pozakomórkowej inkubowanego mięśnia.

Do roztworu inkubacyjnego zamiast znakowanego kwasu palmitynowego dodawano znakowany wielocukier, nie przenikający do wnętrza komórek - [3H]-inulinę (Amersham, TRA324, Anglia) o aktywności 0,1 $\mu Ci/ml$ (Sjogaard 1979). Po 20 min. inkubacji próbki mięśni płukano w soli fizjologicznej, osuszano i zamrażano w ciekłym azocie a następnie rozpuszczano w 0,5 ml 1 N roztworu KOH w temp. 70°C. Po zobojętnieniu hydrolizatu 1 N roztworem HCl i odwirowaniu mierzono radioaktywność 3H w nadsączu i obliczano objętość przestrzeni pozakomórkowej (V_{pk}) inkubowanego mięśnia wg. wzoru [4].

$$[4] \text{ } V_{pk} = \frac{\text{radioaktywność mięśnia} / A_2}{\text{masa mięśnia}} \quad (\mu l / g \text{ ś.m.})$$

A_2 - Radioaktywność buforu inkubacyjnego = ilość impulsów (cpm)/ μl

Określenie puli kwasu palmitynowego niezwiązanego z albuminą (nKT)

Nie wiadomo dokładnie jakie jest stężenie frakcji nKT w osoczu. Jak dotąd nie ma bowiem właściwej metody na określenie stałej dysocjacji dla albuminy (McArthur i wsp. 1999). Wydaje się jednak, że najwłaściwsze wyniki uzyskali Richieri i wsp. (1993), stosując fluorescencyjne akrylodanowe pochodne jelitowych białek wiążących kwasy tłuszczowe (ADIFAB). Wykazali oni, że stężenie nKT w surowicy ludzkiej w spoczynku wynosi ok. 7,5 nM (Richieri i wsp. 1995). Stężenie nKT w surowicy

szczyżej nie zostało jeszcze oznaczone, ale prawdopodobnie jest ono przynajmniej dwa razy wyższe gdyż powinowactwo albuminy mysiej do KT jest dwukrotnie mniejsze od powinowactwa albuminy ludzkiej lub bydłowej (Richieri i wsp. 1993).

U myszy głodzonych stosunek stężeń molarnych KT do albuminy (v) w surowicy krwi wynosi 2,6-4,3 (Coburn i wsp. 2000).

Dlatego też pulę niezwiązanego z albuminą bydłą kwasu palmitynowego (nKP) w przygotowywanych mieszaninach inkubacyjnych wyznaczono teoretycznie na podstawie wzoru [5] opracowanego przez Richieri i wsp. (1993) i tak dobierano stężenie KT i albuminy aby wartość v i stężenie nKP były zbliżone do wartości występujących *in vivo* (Tab. 2).

$$[5] \quad [nKP] = mv + b + ce^{kv}$$

v - stosunek [KP]/[Albuminy]

m, b, c, k – wartości doświadczalnie wyznaczone przez Richieri i wsp. (1993).

TABELA 2

Stężenie frakcji nKP w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej od 0,5 do 1,5 mM kwasu palmitynowego (KP) związanego z albuminą we wzrastającym (W) lub stałym (S) stosunku stężeń molarnych (v).

Stężenie KP (mM)	Stężenie albuminy (mM)	[KP]/[Alb.] (v)	Stężenie nKP (nM)
Grupa W			
0,5	0,221	2,3	13,40
1,0	0,221	4,5	62,28
1,5	0,221	6,8	642,36
Grupa S			
0,5	0,147	3,4	26,80
1,0	0,295	3,4	26,80
1,5	0,442	3,4	26,80

Ocena dyfuzji kompleksu kwasu palmitynowego z albuminą do wnętrza inkubowanego mięśnia

Dyfuzję kompleksu kwasu palmitynowego z albuminą do mięśnia oceniano na podstawie identyfikacji albuminy bydlęcej w preparacie z mięśnia wykorzystując metody immunohistochemiczne. W tym celu próbki mięśnia ($n = 5$) po 20 min. inkubacji w obecności 0,221 mM albuminy, 1,0 mM "zimnego" kwasu palmitynowego i 5,5 mM glukozy utrwalano przez 24 godz. w 4% wodnym roztworze formaldehydu, zawierającym 2% siarczan cynku (Tome i wsp. 1990; Dapson 1993). Następnie pobierano środkową część mięśnia i po przepłukaniu w wodzie destylowanej, odwadniano kolejno w 70, 80 i 96% roztworze alkoholu etylowego odpowiednio przez 3, 1 i 3 godz., a na końcu w *n*-butanolu przez jedną noc. Tak przygotowaną próbkę mięśnia zatapiano w plastycznej parafinie (MEDIM-Plast 52; Medizinische Diagnostic - Methoden GmbH, W- 6300 Giessen, Niemcy) i cięto prostopadle do długiej osi mięśnia na skrawki o grubości 5 μm . Wykorzystując metodę Romeisa i wsp. (1968) uzyskane skrawki rozciągano i usuwano z nich parafinę. Następnie dezaktywowano endogenną peroksydazę inkubując skrawki przez 5 min w 3% wodzie utlenionej. W celu wykrycia obecności albuminy skrawki inkubowano przez 20 min w fosforanowym roztworze monoklonalnych przeciwciał przeciwko albuminie z krwi bydlęcej (Sigma) rozpuszczonych w stosunku 1:100. Następnie po przepłukaniu, skrawki przenoszono do buforu zawierającego kozie przeciwciała IgG przeciwko mysiej peroksydazie (Sigma) rozpuszczone w stosunku 1:100 i zaadsorbowane ze szczurzymi białkami krwi. Aktywność peroksydazy oceniano metodą Grahama i Karnovsky'ego (1966) stosując jako substrat dwuaminobenzodienę (tetra HCl) (Sigma). Kontrolę stanowiły albo skrawki inkubowane w buforze Krebsa-Ringera nie zawierającym albuminy, albo skrawki inkubowane w/g późniejszej procedury bez przeciwciał przeciwko albuminie.

Część immunohistochemiczną badań wykonano w Zakładzie Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie pod kierunkiem p. Prof. dr hab. S. Moskalweskiego.

Oznaczenie stężenia nukleotydów adenylowych w mięśniu

Mięśnie kontrolne ($n = 5$), nie poddane inkubacji zamrażano natychmiast po wyizolowaniu, natomiast pozostałe ($n = 25$) inkubowano w roztworze zawierającym 5,5 mM glukozy, 1,0 mM "zimnego" kwasu palmitynowego i 0,221 mM albuminy w sposób opisany w podrozdziale "przebieg inkubacji mięśnia". Następnie zamrożone próbki mięśni liofilizowano, po czym proszkowano w porcelanowym moździerzu w

temp. pokojowej, usuwając tkankę tłuszczową i ślady krwi. Sproszkowane próbki przenoszono do probówek i zalewano 0,5 M HClO₄ zawierającym 1 mM EDTA-Na₂ w stosunku 1 ml HClO₄ : 12,5 mg proszku. W dalszym etapie prowadzono ekstrakcję w łaźni lodowej 0°C przez 10 min. ciągle wstrząsając. Po odwirowaniu (1 min. ; 6000 obr. / min.) nadsącz zlewano do nowych probówek i zobojętniano 2,1 mM KHCO₃ (1 obj. KHCO₃ : 4 obj. HClO₄). W ekstrakcie oznaczano stężenie ATP, ADP, AMP i CrP stosując enzymatyczną mikrometodę opisaną przez Harris'a i wsp. (1974). Ekstynkcję mierzono na spektrofotometrze EPOLL przy długości fali 340 nm.

Dodatkowo obliczono potencjał energetyczny komórki, wykorzystując wzór opisany przez Aktinsona (1968).

Oznaczenie stężenia triacylogliceroli (TG) w mięśniu i w surowicy krwi

Próbkę mięśnia o masie ok. 50 mg, oczyszczoną z tkanki tłuszczowej i łącznej oraz krwi zalewano mieszaniną Folcha w stosunku 1 : 20 (w/v) i ekstrahowano przez 24 godz. w szczelnie zamkniętej probówce w temperaturze pokojowej. Następnie ekstrakt przemywano dwiema porcjami soli fizjologicznej po 0,5 ml i odwirowywano (15 min. ; 2500 obr./min.). Dolną chloroformową warstwę ekstraktu, zawierającą TG, zachowywano i na końcu odparowywano do sucha w strumieniu azotu. Wyekstrahowane w ten sposób TG hydrolizowano do glicerolu i kwasów tłuszczowych 0,5 M etanolemowym roztworem KOH w temp. 70 °C przez 20 min. Po ostudzeniu roztwór zobojętniano 0,15 M MgSO₄ i odwirowywano (3000 obr. / min. ; 10 min.). W nadsączu w kilku reakcjach enzymatycznych z udziałem kinazy glicerolowej, kinazy pirogronianowej i dehydrogenazy mleczanowej określano stężenie glicerolu według metody opisaną przez Eggstein i Kuhlmana (1973). Ekstynkcję odczytywano w spektrofotometrze EPOLL przy długości fali 340 nm.

Stężenie TG w osoczu krwi oznaczano również metodą Eggsteina i Kuhlmana po uprzednim zhydrolizowaniu TG do glicerolu i kwasów tłuszczowych za pomocą 0,5 M etanolemowego roztworu KOH w temp. 70°C przez 20 min.

Oznaczenie stężenia niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (KT) w surowicy krwi

Stężenie KT we krwi oznaczano spektrofotometrycznie, stosując mikrometodę opisaną przez Shimizu i wsp. (1979), której zasada oparta jest na aktywacji WKT w cyklu sprzężonych reakcji enzymatycznych zapoczątkowywanych przez bakteryjną syntetazę acyloCoA w obecności ATP i CoA. Ekstynkcję odczytywano w spektrofotometrze EPOLL (Polska) przy długości fali 340 nm.

Analiza statystyczna wyników

Uzyskane wyniki poddano obliczeniom statystycznym. Wyliczano wartości średnie (\bar{x}) i błąd standardowy (SE). Dla oceny różnic istotnych statystycznie stosowano test t- Studenta dla prób niezależnych, uznając za istotną różnicę przy $p < 0,05$. W niektórych seriach doświadczalnych zastosowano ponadto analizę regresji i obliczano współczynniki korelacji pomiędzy wybranymi wskaźnikami.

5. WYNIKI

Ocena zastosowanej metody

W Tabeli 3 przedstawiono zawartość związków wysokoenergetycznych (ATP, CrP) oraz wartości potencjału energetycznego (ECP) oznaczone w mięśniu płaszczkowatym kontrolnym, w różnym czasie inkubacji poprzedzonej pre-inkubacją. Jak z niej wynika oceniane wskaźniki nie różniły się istotnie od uzyskanych w mięśniach kontrolnych, nie poddanych inkubacji. Po 20 min inkubacji stężenie ATP było najbardziej zbliżone do wartości kontrolnych i wynosiło $24,93 \pm 1,59$ $\mu\text{mol/g}$ suchej masy, podczas gdy po 30 min inkubacji miało tendencję do obniżenia. ECP był również najwyższy po 20 min inkubacji i wynosił $0,905 \pm 0,009$.

TABELA 3

Zawartość związków wysokoenergetycznych (ATP, CrP) oraz potencjał energetyczny komórki (ECP) w mięśniu płaszczkowatym przed i po 15 min pre-inkubacji oraz po 10, 20 i 30 min inkubacji w buforze Krebsa-Ringera zawierającym 1,0 mM kwasu palmitynowego, 0,221 mM albuminy i 5,5 mM glukozy.

	Czas (min)				
	0	15 pre-inkubacji	10 inkubacji	20 inkubacji	30 inkubacji
ATP	$25,57 \pm 1,09$ (n= 5)	$22,61 \pm 1,09$ (n= 5)	$22,59 \pm 0,91$ (n= 5)	$24,93 \pm 1,59$ (n= 9)	$21,90 \pm 1,36$ (n= 5)
CrP	$56,52 \pm 1,51$ (n= 5)	$54,06 \pm 3,29$ (n= 5)	$56,65 \pm 0,85$ (n= 5)	$51,16 \pm 1,47$ (n= 5)	$58,42 \pm 1,01$ (n= 5)
ECP	$0,872 \pm 0,019$ (n= 5)	$0,822 \pm 0,006$ (n= 5)	—————	$0,905 \pm 0,009$ (n= 5)	$0,866 \pm 0,006$ (n= 5)

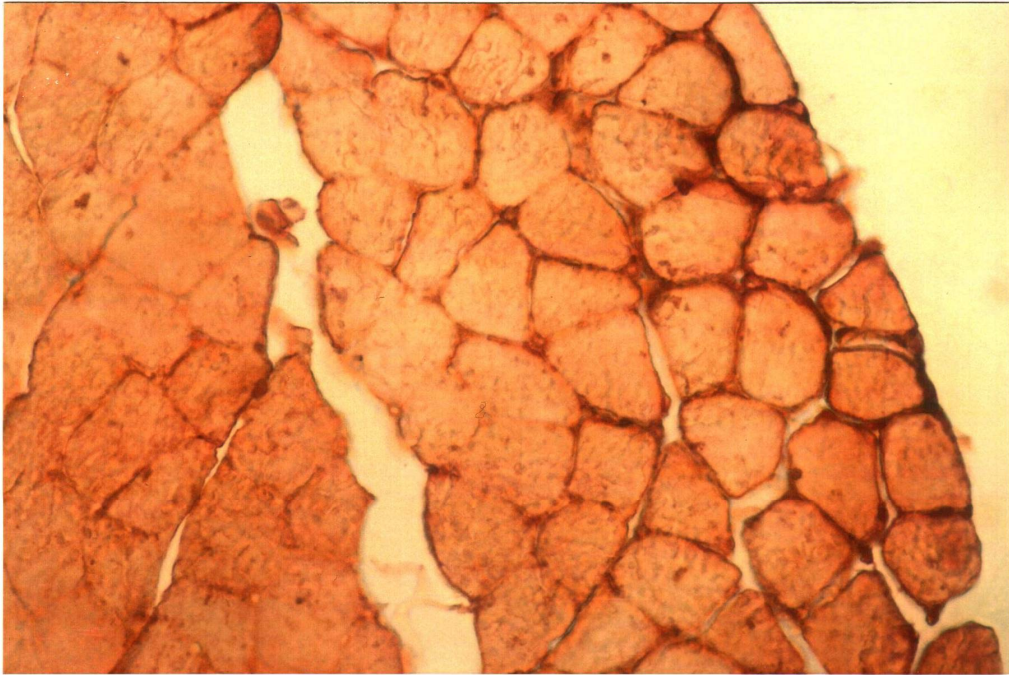
Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz ilość próbek mięśni (n).

Stężenie ATP i CrP wyrażono w $\mu\text{molach/g}$ suchej tkanki.

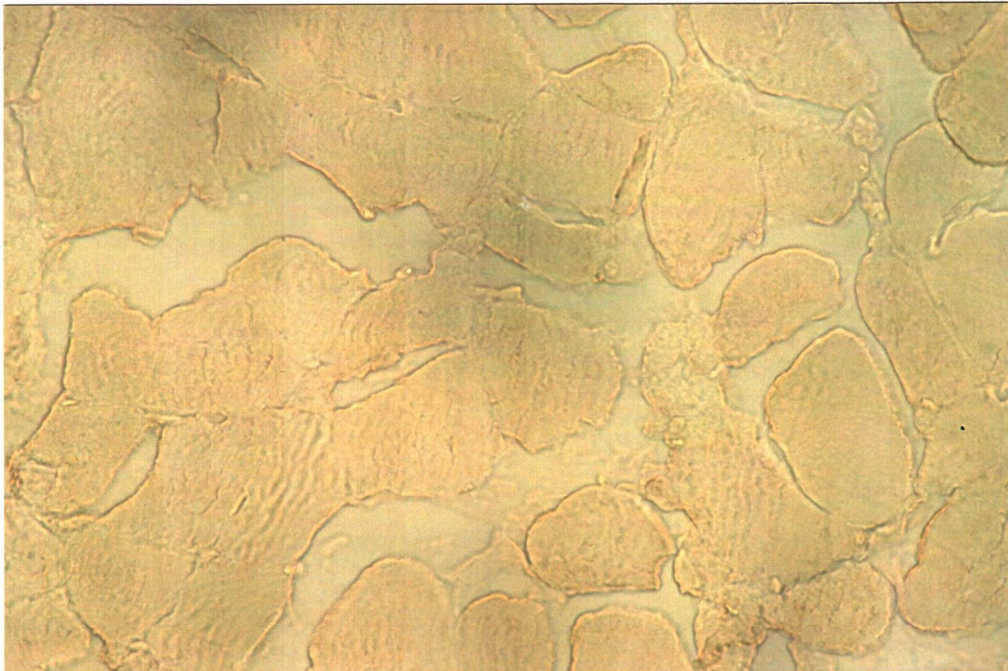
Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami uzyskanymi w czasie inkubacji.

Za pomocą techniki immunohistochemicznej, z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko albuminie bydłowej wykazano, że KP w kompleksie z albuminą penetruje do wnętrza inkubowanego mięśnia. Obecność albuminy, widoczną jako brązowe wybarwienie tkanki wykrywano zarówno na obrzeżach jak i w środkowej części skrawków mięśnia (Ryc.1A.).

A.



B.



Ryc. 1

Penetracja albuminy związanej z kwasem palmitynowym do wnętrza inkubowanego mięśnia płaszczkowego [A.]. Kontrolę stanowiły skrawki mięśnia, które inkubowano w buforze Krebsa-Ringera bez albuminy lub w/g późniejszej procedury bez przeciwciał przeciwko albuminie [B.].

Należy jednak zaznaczyć, że nieco lepiej wybarwiały się brzegi preparatów, zwłaszcza w miejscu przecięcia mięśnia, gdzie została uszkodzona sarkolemma włókien mięśniowych.

Sporadycznie widoczne na obwodzie światła naczyń krwionośnych nie były silniej wybarwione niż pozostałe fragmenty skrawka.

Kontrolne skrawki mięśni, które inkubowano w buforze nie zawierającym albuminy lub w roztworze bez przeciwciała przeciwko albuminie, albo nie wybarwiały się wcale, albo miały bardzo słabo wybarwione zewnętrzne włókna mięśniowe (Ryc.1B.).

Wartości charakteryzujące wychwyty KP, jego utlenianie do CO₂ i wbudowywanie w lipidy wewnątrzmięśniowe przez mięsień płaszczkowy w zależności od czasu inkubacji przy 1,0 mM stężeniu KP w mieszaninie inkubacyjnej podsumowano w Tabeli 4.

TABELA 4

Wychwyty kwasu palmitynowego (W_{KP}), jego utlenianie do dwutlenku węgla (CO₂) i wbudowywanie do triacylogliceroli (TG), mono- i diacylogliceroli (MG/DG) oraz fosfolipidów (PL) przez mięsień płaszczkowy inkubowany przez 10, 20 lub 30 minut w buforze Krebsa-Ringera zawierającym 0,221 mM albuminy, 1,0 mM kwasu palmitynowego i 5,5 mM glukozy.

	Czas inkubacji (min.)		
	10	20	30
W_{KP}	114,0 ± 6,9 (n= 13)	218,6 ± 7,8 (n= 15)	303,5 ± 7,4 (n= 14)
CO₂	5,05 ± 0,40 (n= 21)	10,44 ± 0,92 (n= 23)	16,43 ± 1,14 (n= 25)
TG	39,7 ± 2,1 (n= 28)	96,2 ± 5,2 (n= 34)	135,0 ± 6,9 (n= 32)
MG/DG	12,3 ± 0,7 (n= 13)	17,1 ± 0,6 (n= 15)	26,9 ± 1,7 (n= 16)
PL	29,2 ± 1,6 (n= 13)	47,8 ± 2,0 (n= 15)	81,0 ± 5,7 (n= 12)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz ilość próbek mięśni (n).

Wartości badanych wskaźników wyrażono w nmolach KP/g mokrej tkanki.

Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi w różnym czasie inkubacji w stosunku do 10 min. oznaczono krzyżykami (+), natomiast różnice w wartości pomiędzy 20 i 30 min. inkubacji trójkątami (▲) (+ + p<0,01; + + + p<0,001; ▲ p<0,05; ▲ ▲ p<0,01; ▲ ▲ ▲ p<0,001).

Wychwyty KP zmierzony w 20 minucie inkubacji był wyższy o 92% (p<0,001) od wartości stwierdzonych po 10 min. Natomiast w ciągu następnych 10 min inkubacji nastąpiło wprawdzie dalsze istotne (p<0,001) zwiększenie wychwyty KP przez mięsień

płaszczkowaty, ale tempo przyrostu pomiędzy 20 a 30 min. było nieco niższe i wynosiło średnio 39%.

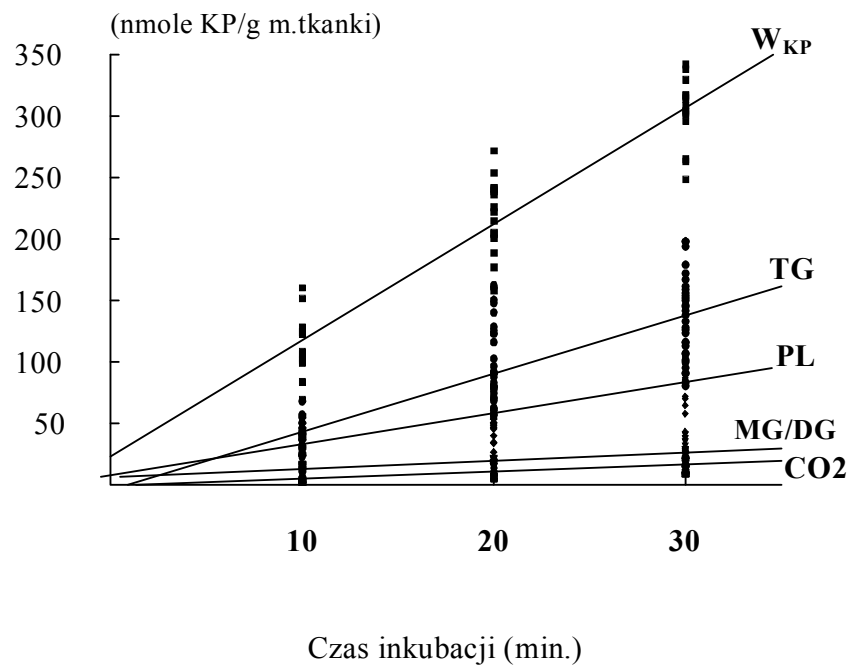
Stwierdzono, że ilość CO_2 uwolnionego przez inkubowany mięsień płaszczkowaty zwiększała się w miarę wydłużania czasu inkubacji a kolejne przyrosty przekraczały wartości uzyskane po 10 min. o 106% w 20 min. ($p < 0,001$) i o 57% między 20 a 30 min. ($p < 0,05$).

Wraz z przedłużaniem się czasu inkubacji zwiększała się ilość KP estryfikowanego do TG. Po 20 min. nastąpił znaczny ($p < 0,001$) wzrost tej wartości, średnio o 142%. Pomiedzy 20 a 30 min. inkubacji przyrost wyniósł ok. 40% ($p < 0,001$).

W miarę wydłużania się czasu inkubacji zwiększała się również istotnie ilość KP wbudowywanego w pulę MG/DG. Różnice pomiędzy wartościami stwierdzonymi w 10 i 30 min. oraz 20 i 30 min. były istotne statystycznie ($p < 0,01$).

Średni przyrost KP wbudowywanego w pulę fosfolipidów (PL) wynosił po 20 min. inkubacji 64% ($p < 0,01$) a po kolejnych 10 min średnio o 69% więcej ($p < 0,001$). Analiza regresji uzyskanych wyników wykazała istnienie istotnych liniowych współzależności pomiędzy zmianami badanych wskaźników a czasem trwania inkubacji (Ryc. 2).

Tempo wychwytu KP, jego utleniania do CO_2 oraz wbudowywania w PL mierzone w 10, 20 i 30 min inkubacji utrzymywało się na stałym poziomie i wynosiło dla wychwytu 10,1-11,4; dla utleniania 0,51-0,55; dla syntezy PL 2,4-2,9 nmoli KP/min./g mokrej tkanki. Tempo syntezy TG w ciągu 20 min inkubacji wynosiło natomiast $4,8 \pm 0,3$ nmole KP/min./g mokrej tkanki i było istotnie wyższe ($p < 0,05$) od stwierdzonego w 10 min ($3,97 \pm 0,2$) oraz niewiele wyższe od wartości uzyskanej po 30 min. ($4,5 \pm 0,2$). Tempo wbudowywania KP w pulę MG/DG w ciągu pierwszych 10 min inkubacji wynosiło $1,2 \pm 0,07$ nmole KP/min./g mokrej tkanki, następnie obniżało się w 20 min do 0,9 nmola KP/min./g m.tkanki ($p < 0,001$) i na tym poziomie utrzymało się do końca inkubacji.



W_{KP}	$y = 9,46 x + 23,05$; $r = 0,941^{**}$ (n = 42)
CO₂	$y = 0,57 x - 0,76$; $r = 0,733^{**}$ (n = 69)
TG	$y = 4,74 x - 4,26$; $r = 0,809^{**}$ (n = 94)
MG/DG	$y = 0,74 x + 3,99$; $r = 0,797^{**}$ (n = 44)
PL	$y = 2,58 x + 0,41$; $r = 0,845^{**}$ (n = 40)

Ryc. 2

Współzależności pomiędzy wychwytem kwasu palmitynowego (W_{KP}) przez mięsień płaszczkowy, jego utlenianiem do dwutlenku węgla (CO₂) i wbudowywaniem w triacyloglicerole (TG), mono- i diacyloglicerole (MG/DG) oraz fosfolipidy (PL) a czasem trwania inkubacji.

Podano równania regresji, współczynniki korelacji (**r**) oraz ilość próbek mięśni (n). Gwiazdkami (**) oznaczono statystycznie istotne wartości współczynnika **r** przy $p < 0,01$.

Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej glukozy w stężeniu fizjologicznym (5,5 mM) nie zmniejszyło istotnie tempa utleniania KP do CO₂ (o ok. 7%), natomiast o 69% ($p < 0,001$) podwyższyło tempo wbudowywania kwasu palmitynowego w pulę TG.

Po analizie wyżej przedstawionych wyników postanowiono we wszystkich następnych doświadczeniach inkubować mięśnie przez 20 min w mieszaninie zawierającej oprócz buforu Krebsa-Ringera i kwasu palmitynowego glukozę w stężeniu 5,5 mM.

Dane dotyczące tempa wychwyty KP przez mięsień płaszczkowaty, utleniania do CO₂ i wbudowywania się w acyloglicerole w zależności od całkowitego stężenia kwasu w mieszaninie inkubacyjnej zebrano w Tabeli 5.

TABELA 5

Tempo wychwyty kwasu palmitynowego (W_{KP}), tempo jego utleniania do dwutlenku węgla (CO₂) oraz wbudowywania do triacylogliceroli (TG), mono- i diacylogliceroli (MG/DG) i fosfolipidów (PL) przez mięsień płaszczkowaty inkubowany przez 20 min. w buforze Krebsa-Ringera zawierającym różne stężenia KP (0,5; 1,0 lub 1,5 mM) oraz 0,221 mM albuminy i 5,5 mM glukozy.

	Stężenie KP (mM)		
	0,5	1,0	1,5
W_{KP}	4,59 ± 0,36 (n= 12)	8,86 ± 0,62 (n= 12)	14,11 ± 0,74 (n= 12)
CO₂	0,316 ± 0,053 (n= 12)	0,504 ± 0,068 (n= 15)	1,187 ± 0,102 (n= 15)
TG	2,29 ± 0,18 (n= 17)	4,75 ± 0,29 (n= 22)	6,37 ± 0,38 (n= 17)
MG/DG	0,530 ± 0,035 (n= 20)	0,858 ± 0,052 (n= 19)	1,030 ± 0,087 (n= 17)
PL	1,19 ± 0,11 (n= 16)	1,94 ± 0,14 (n= 15)	2,63 ± 0,30 (n= 12)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz ilość próbek mięśni (n).

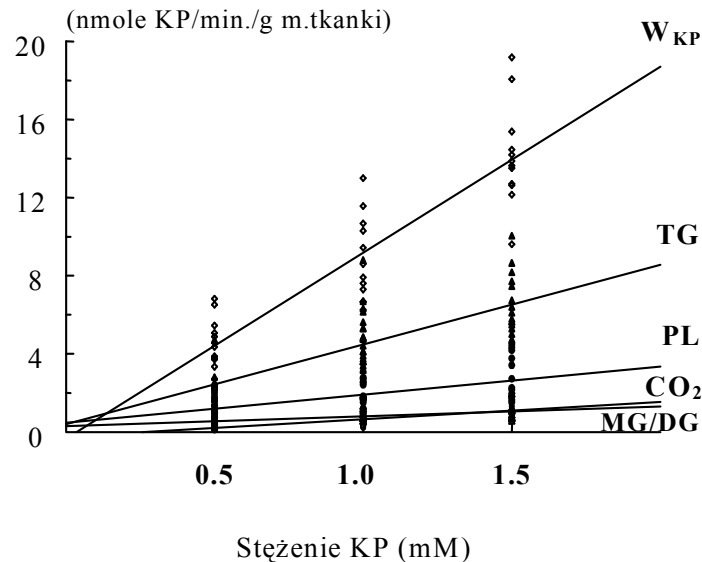
Wartości badanych wskaźników wyrażono w nmolach KP/min/g mokrej tkanki.

Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi przy różnych stężeniach KP w roztworze w stosunku do 0,5 mM oznaczono krzyżykami (+), natomiast różnice w wartości pomiędzy 1,0 i 1,5 mM KP trójkątami (▲) (+++ p < 0,001; ▲▲ p < 0,01; ▲▲▲ p < 0,001).

Inkubując mięśnie w roztworze zawierającym wzrastające stężenie kwasu palmitynowego (0,5; 1,0; 1,5 mM) przy stałym stężeniu albuminy (0,221%) stwierdzono, że tempo wychwyty tego kwasu przez mięsień płaszczkowaty istotnie wzrasta (p<0,001). Zwiększało się również wysoce istotnie tempo utlenianie KP (o około 275% przy 1,5 mM w stosunku do 0,5 mM KP).

Tempo wbudowywania KP w pule TG, MG/DG i PL w obecności 1,5 mM KP w mieszaninie inkubacyjnej było istotnie wyższe (p<0,001) od stwierdzonego przy 0,5 mM, odpowiednio o około 178%, 94% i 121%.

Analiza regresji uzyskanych wyników wykazała istnienie ścisłej liniowej współzależności pomiędzy stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej a tempem jego wychwytu, utleniania do CO₂ oraz estryfikacji w pule TG, MG/DG i PL (Ryc.3).



$$W_{KP} \quad y = 9,520 x - 0,34; r = 0,890^{**} \quad (n = 36)$$

$$CO_2 \quad y = 0,891 x - 0,23; r = 0,752^{**} \quad (n = 42)$$

$$TG \quad y = 4,081 x + 0,41; r = 0,784^{**} \quad (n = 56)$$

$$MG/DG \quad y = 0,504 x + 0,30; r = 0,630^{**} \quad (n = 56)$$

$$PL \quad y = 1,446 x + 0,47; r = 0,663^{**} \quad (n = 43)$$

Ryc. 3

Współzależność pomiędzy wychwytem kwasu palmitynowego (W_{KP}) przez mięsień płaszczkowy, jego utlenianiem do CO₂ (CO₂) i wbudowywaniem w triacyloglicerole (TG), mono- i diacyloglicerole (MG/DG) oraz fosfolipidy (PL) a całkowitym stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej.

Podano równania regresji, współczynniki korelacji (r) oraz ilość próbek mięśni (n). Gwiazdkami (**) oznaczono statystycznie istotne wartości współczynnika r przy $p < 0,01$.

Wykorzystując technikę chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono, że wraz z przedłużaniem się czasu inkubacji z 10 do 20-30 min zwiększyła się radioaktywność we frakcji TG z 49% do 57-60% ($p < 0,05$) a obniżyła się radioaktywność we frakcji

DG/MG z 17% do 11% ($p < 0,001$). Udział procentowy KP we frakcji PL był natomiast w miarę stały i wynosił 30-34%.

Wbudowywanie KP w wewnątrzkomórkowe frakcje lipidowe nie zależało również od stężenia KP w mieszaninie inkubacyjnej i wynosiło 58-63% dla TG, 10-13% dla MG/DG oraz 27-29% dla PL.

Początkowo wydawało się że znaczna radioaktywność (30-60% całkowitej) występuje również we frakcji kwasów tłuszczowych. Po uwzględnieniu przestrzeni pozakomórkowej, która wynosiła średnio $214,9 \pm 9,0 \mu\text{l/g}$ mokrej tkanki ($n = 23$), okazało się jednak że kwas palmitynowy znajdował się głównie w przestrzeni pozakomórkowej, natomiast wewnątrzkomórkowe stężenie KP w tych warunkach doświadczalnych było niemierzalne.

Wpływ puli kwasu palmitynowego niezwiązanego z albuminą (nKP) na wychwyty i metabolizm kwasu palmitynowego w inkubowanym mięśni płaszczkowatym

Porównanie wyników badań uzyskanych przy wzrastającym (grupa **W**) lub stałym (grupa **S**) stosunku molarnym $[\text{KP}]/[\text{Alb}]$ (v), czyli przy wzrastającym i stałym stężeniu frakcji KP niezwiązanego z albuminą KP (nKP) zebrano w Tabeli 6 (patrz str. 53).

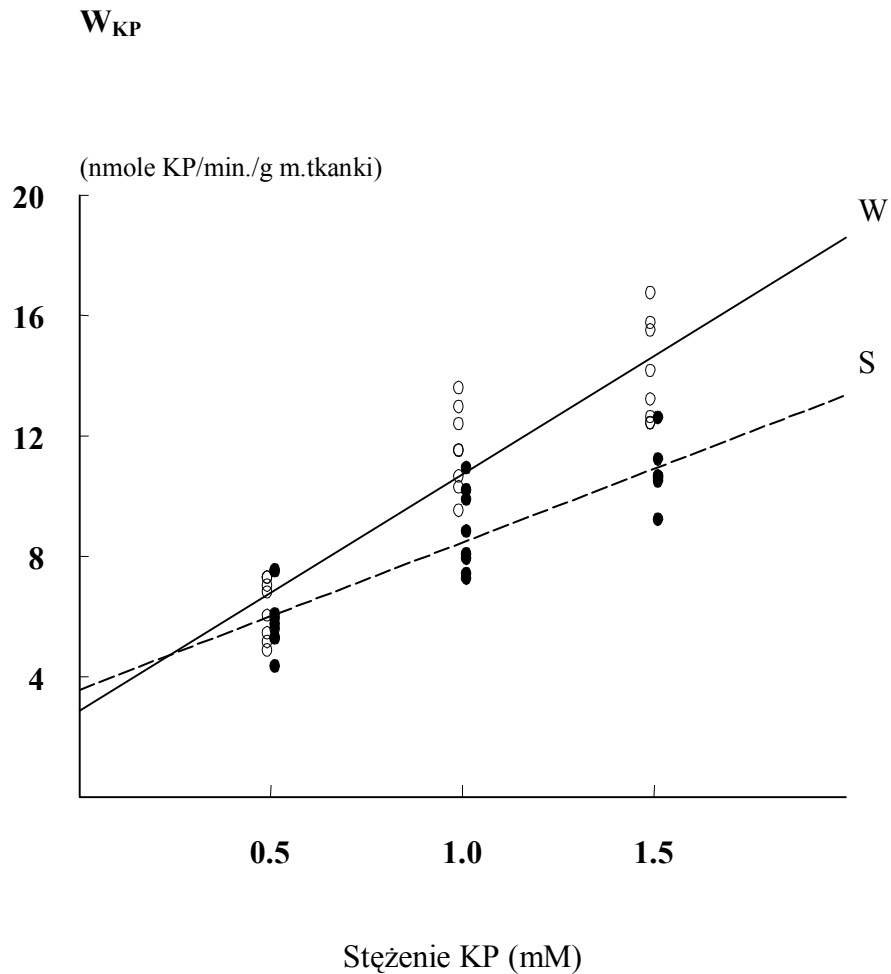
Wykazano, że niezależnie od tego czy wartość v wzrastała (grupa **W**) czy pozostawała na niezmiennym poziomie (grupa **S**) wychwyty KP przez inkubowany mięsień płaszczkowaty zwiększał się wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP w mieszaninie inkubacyjnej. W obydwu grupach kolejne wartości uzyskane przy całkowitym stężeniu KP 1,0 i 1,5 mM okazały się istotnie wyższe niż przy stężeniu 0,5 mM ($p < 0,01$) (Tab. 6).

Analiza regresji wykazała istnienie liniowej współzależności pomiędzy stężeniem kwasu palmitynowego w roztworze a tempem jego wychwyty zarówno w grupie **W** jak i **S** (Ryc. 4). Uzyskano następujące równania regresji:

grupa **W** $y = 7,866 x + 2,784$; ($r = 0,911$; $n = 24$; $p < 0,01$);

grupa **S** $y = 4,886 x + 3,634$; ($r = 0,875$; $n = 24$; $p < 0,01$).

Kiedy jednak porównano współczynniki a , charakteryzujące nachylenie prostej regresji do osi X ($y = a x + b$) obliczone dla poszczególnych zwierząt z każdej grupy stwierdzono, że były one istotnie niższe ($p < 0,001$) u szczurów z grupy **S** niż z grupy **W**.



Ryc. 4

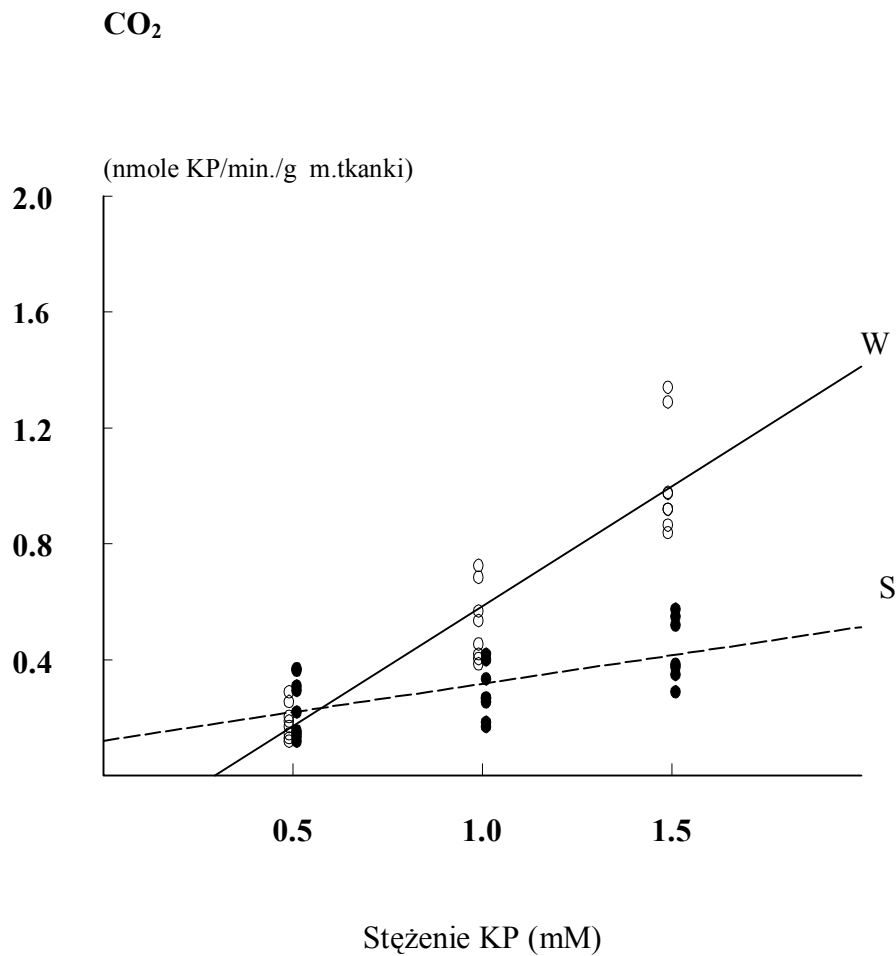
Współzależność pomiędzy tempem wychwytu kwasu palmitynowego przez mięsień płaszczkowy (W_{KP}) a całkowitym stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej przy wzrastającym (W) i stałym (S) stosunku molarnym $[KP]/[Alb]$.

Kółkami pustymi (o) oznaczono grupę W, a pełnymi (•) grupę S.

W grupie **W** wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP w roztworze inkubacyjnym tempo jego utleniania wzrastało liniowo od $0,188 \pm 0,021$ przy 0,5 mM do $1,016 \pm 0,068$ nmoli KP/min./g mokrej tkanki przy 1,5 mM ($p < 0,001$), natomiast w grupie **S** tempo produkcji CO_2 przez ten mięsień wzrastało tylko nieznacznie choć istotnie statystycznie (od $0,235 \pm 0,034$ nmoli KP/min./g mokrej tkanki do $0,435 \pm 0,042$ przy 1,5 mM; $p < 0,01$) (Tab. 6).

Analiza regresji wykazała istnienie w obydwu grupach liniowej współzależności pomiędzy tempem utleniania kwasu palmitynowego a jego całkowitym stężeniem (Ryc. 5)

Z porównania współczynników a równań regresji wynika natomiast, że były one istotnie niższe ($p < 0,01$) w przypadku mięśni inkubowanych w warunkach stałego stosunku stężeń molarnych KP i albuminy - v niż przy wzrastającym v .



$$W \quad y = 0,827 x - 0,252; \quad r = 0,929^{**} \quad (n = 24)$$

$$S \quad y = 0,196 x + 0,123; \quad r = 0,633^{**} \quad (n = 24)$$

Ryc. 5

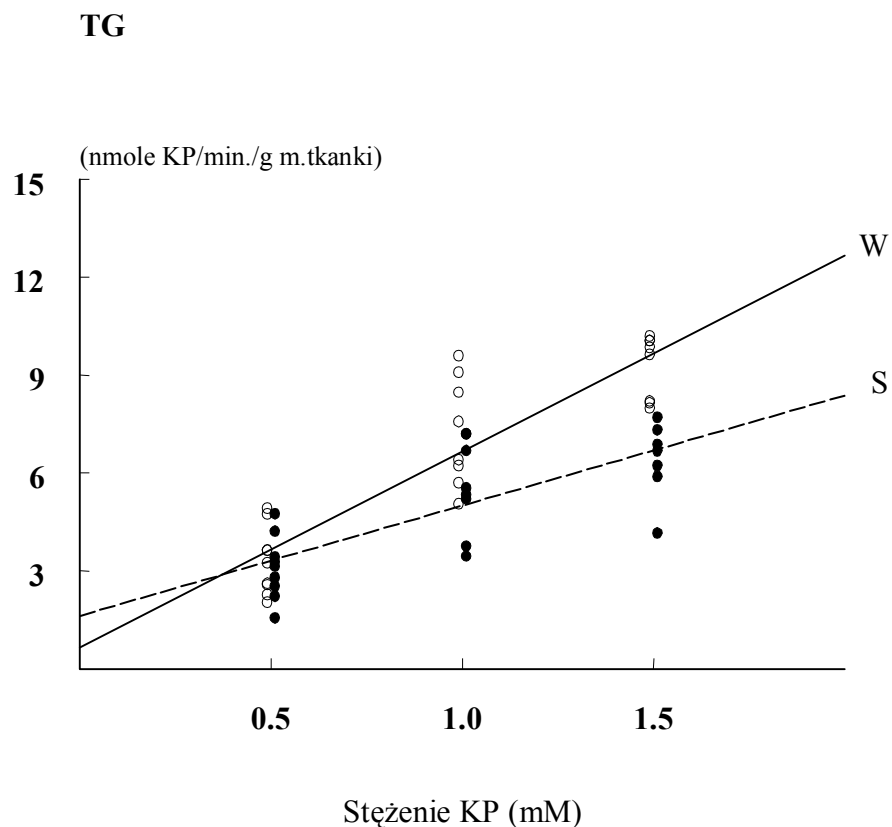
Współzależność pomiędzy tempem utleniania kwasu palmitynowego do CO₂ a całkowitym stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej przy wzrastającym (W) i stałym (S) stosunku molarnym [KP]/[Alb].

Podano równania regresji, współczynnik korelacji (r) oraz ilość próbek mięśni (n). Kółkami pustymi (o) oznaczono grupę W, a pełnymi (•) grupę S. Gwiazdkami (**) oznaczono statystycznie istotne wartości współczynnika r przy $p < 0,01$.

W mięśniu płaszczkowatym inkubowanym w medium o wzrastającym stosunku molarnym KP i albuminy (grupa **W**) tempo wbudowywania tego kwasu w pulę TG wzrastało liniowo ($p < 0,05$). Podobnie było w grupie **S**, pomimo utrzymywania stałej wartości v (Tab. 6).

Istnienie współzależności pomiędzy całkowitym stężeniem kwasu palmitynowego w roztworze a tempem jego wbudowywania w TG w warunkach stałego v (grupa **S**) potwierdziło wykazanie istotnego współczynnika korelacji $r = 0,756$ ($p < 0,01$) obliczonego przy równaniu regresji: $y = 3,272 x + 1,725$ ($n = 24$). W grupie **W** był on tylko nieco wyższy i wynosił $r = 0,890$ ($p < 0,01$) przy równaniu regresji: $y = 5,999 x + 0,604$ ($n = 24$) (Ryc. 6).

Współczynniki a omawianych wyżej równań regresji, świadczące o tempie przyrostu ocenianego wskaźnika były jednak istotnie niższe ($p < 0,05$) w grupie **S** niż w grupie **W**.



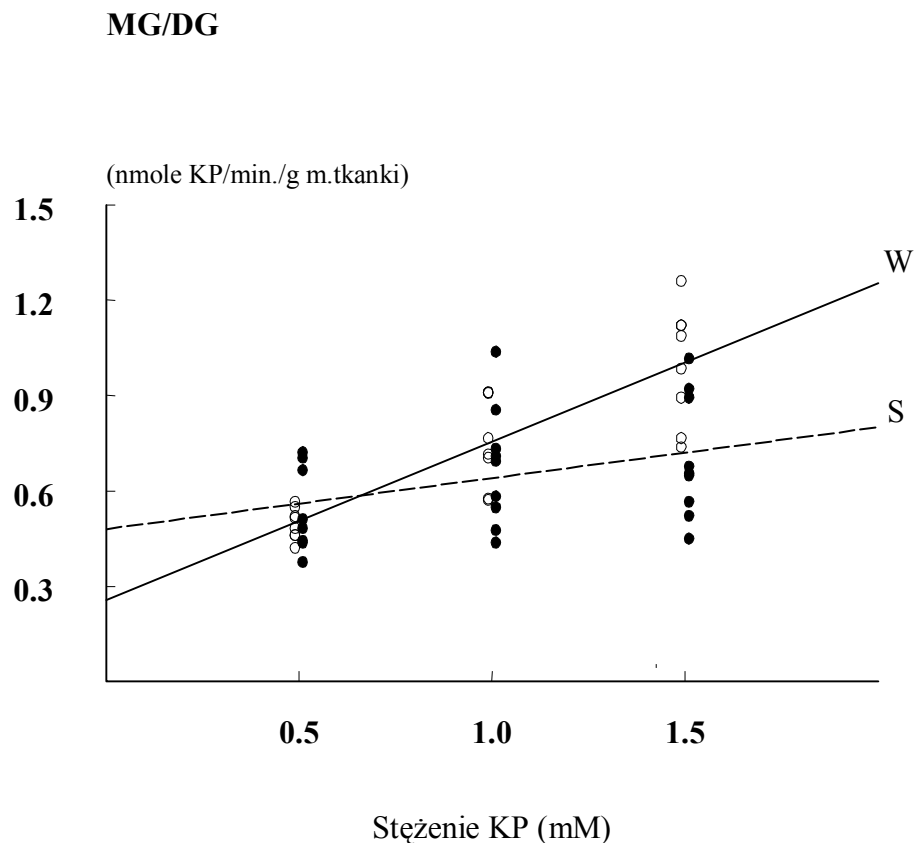
Ryc. 6

Współzależność pomiędzy tempem wbudowywania kwasu palmitynowego w triacyloglicerole (TG) a całkowitym stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej przy wzrastającym (W) i stałym (S) stosunku molarnym [KP]/[Alb].

Kółkami pustymi (o) oznaczono grupę **W**, a pełnymi (●) grupę **S**.

Wbudowywania KP we frakcję MG/DG w grupie **W** zwiększało się wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP w roztworze od $0,498 \pm 0,017$ przy 0,5 mM KP do $0,997 \pm 0,065$ nmoli KP/min./g mokrej tkanki przy 1,5 mM ($p < 0,001$), natomiast w grupie **S** przyrost ocenianego tempa był nieznaczny i nieistotny. Analiza regresji wykazała istnienie liniowej współzależności pomiędzy tempem syntezy MG/DG a całkowitym stężeniem KP w roztworze w obydwu badanych grupach (Ryc.7), przyczym współczynnik korelacji w grupie **W** wynosił $r = 0,845$ ($p < 0,01$) natomiast w grupie **S** tylko $r = 0,359$ ($p < 0,05$).

Poza tym wykazano, że współczynniki **a** nachylenia prostej regresji do osi X w grupie **S** były istotnie niższe od obliczonych dla grupy **W** ($p < 0,01$).



$$\mathbf{W} \quad y = 0,499 x + 0,252 \quad (n = 24)$$

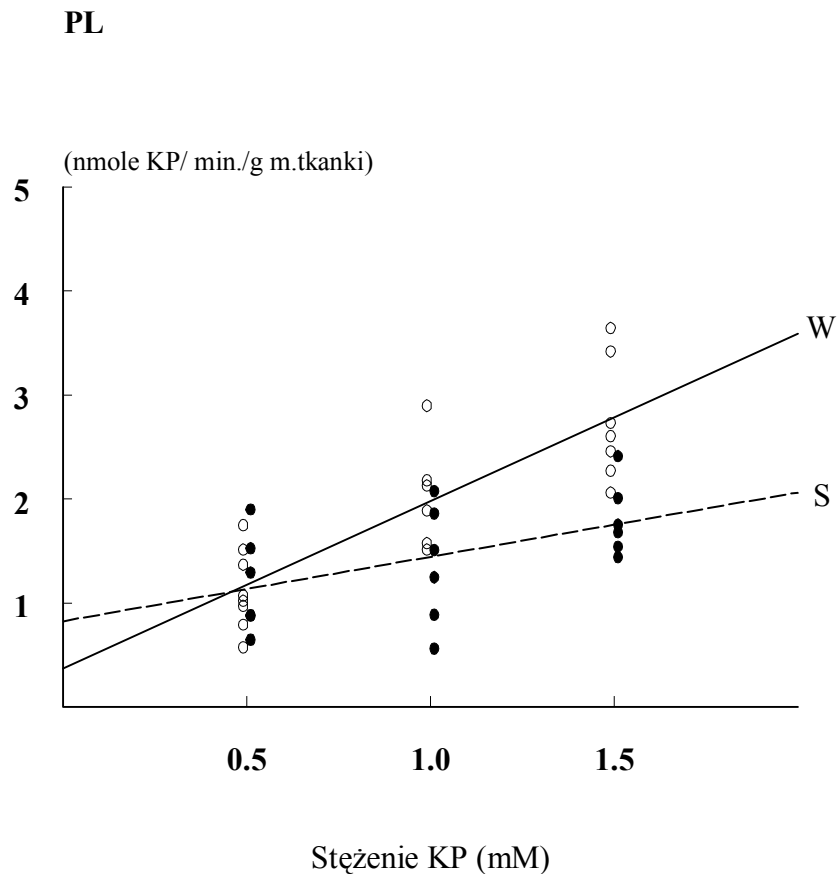
$$\mathbf{S} \quad y = 0,160 x + 0,482 \quad (n = 26)$$

Ryc. 7

Współzależność pomiędzy tempem wbudowywaniem KP w mono- i diacyloglicerole (MG/DG) a całkowitym stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej przy wzrastającym (W) i stałym (S) stosunku molarnym [KP]/[Alb].

Podano równania regresji oraz ilość próbek mięśni (n). Kółkami pustymi (o) oznaczono grupę W, a pełnymi (•) grupę S.

Liniową zależność pomiędzy tempem syntezy PL a całkowitym stężeniem KP w roztworze inkubacyjnym stwierdzono w obydwu grupach (Tab. 6 i Ryc. 8). Znacznie wyższy współczynnik korelacji uzyskano jednak w grupie **W** $r = 0,844$ ($p < 0,01$) niż w grupie **S** ($r = 0,499$; $p < 0,05$) a średnie wartości współczynnika a pomiędzy grupami również różniły się istotnie ($p < 0,05$).



$$\mathbf{W} \quad y = 1,696 x + 0,230 \quad (n = 24)$$

$$\mathbf{S} \quad y = 0,618 x + 0,310 \quad (n = 18)$$

Ryc. 8

Współzależność pomiędzy tempem wbudowywaniem kwasu palmitynowego w fosfolipidy (PL) przez mięsień płaszczkowy a całkowitym stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej przy wzrastającym (W) i stałym (S) stosunku molarnym [KP]/[Alb].

Podano równania regresji oraz ilość próbek mięśni (n). Kółkami pustymi (o) oznaczono grupę **W**, a pełnymi (•) grupę **S**.

TABELA 6

Tempo wychwytu kwasu kwasu palmitynowego (W_{KP}), tempo jego utleniania do dwutlenku węgla (CO_2) oraz tempo wbudowywania KP w triacyloglicerole (TG), mono- i diacyloglicerole (MG/DG) i fosfolipidy (PL) przez mięsień płaszczkowy inkubowany w buforze Krebsa-Ringera zawierającym 0,5-1,5 mM KP związanego z albuminą we wzrastającym (W) lub stałym (S) stosunku molarnym $[KP]/[Alb.]$.

(nmole KP/min/g m.tkanki)

Grupa W			
[KP] (mM)	0,5	1,0	1,5
[KP]/[Alb.]	2,3	4,5	6,8
[nKP] (nM)	13,40	62,28	642,36
W_{KP}	6,26 ± 0,35 (n= 8)	+++ 11,57 ± 0,49 (n= 8)	+++ ▲ ▲ 14,12 ± 0,60 (n= 8)
CO_2	0,188 ± 0,021 (n= 8)	+++ 0,522 ± 0,046 (n= 8)	+++ ▲ ▲ ▲ 1,016 ± 0,068 (n= 8)
TG	3,31 ± 0,35 (n= 8)	+++ 7,28 ± 0,59 (n= 8)	+++ ▲ 9,27 ± 0,34 (n= 8)
MG/DG	0,498 ± 0,017 (n= 8)	+++ 0,758 ± 0,050 (n= 8)	+++ ▲ 0,997 ± 0,065 (n= 8)
PL	1,05 ± 0,12 (n= 7)	+++ 1,99 ± 0,18 (n= 7)	+++ ▲ 2,74 ± 0,22 (n= 7)
Grupa S			
[KP] (mM)	0,5	1,0	1,5
[KP]/[Alb.]	3,4	3,4	3,4
#[nKP] (nM)	26,80	26,80	26,80
W_{KP}	5,94 ± 0,35 (n= 9)	++ 8,83 ± 0,49 (n= 8)	+++ ▲ 10,79 ± 0,38 (n= 7)
CO_2	0,235 ± 0,034 (n= 9)	0,288 ± 0,032 (n= 8)	++ ▲ 0,435 ± 0,042 (n= 7)
TG	3,11 ± 0,33 (n= 9)	+ 5,56 ± 0,51 (n= 8)	+++ 6,42 ± 0,44 (n= 7)
MG/DG	0,513 ± 0,053 (n= 8)	0,675 ± 0,063 (n= 9)	0,705 ± 0,065 (n= 9)
PL	1,19 ± 0,19 (n= 6)	1,36 ± 0,23 (n= 6)	+ 1,81 ± 0,14 (n= 6)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz liczbę próbek mięśni (n).

Krzyżykami (+) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla różnych stężeń kwasu palmitynowego w roztworze inkubacyjnym w porównaniu do stężenia 0,5 mM oraz trójkątami (▲) dla różnic pomiędzy stężeniami 1,0 i 1,5 mM (+ p < 0,05 ; +++ p < 0,001; ▲ p < 0,05).

[nKP] - stężenie niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego obliczone wg. wzoru Richieri i wsp. (1993) (patrz Tab. 2 w rozdziale Materiał i metody).

Niezależnie od tego czy stężenie frakcji nKT utrzymywało się na stałym poziomie czy też wzrastało procentowy udział KP w lipidach wewnątrzkomórkowych nie różnił się pomiędzy badanymi grupami i wynosił 63-72% dla TG, 7-12% dla MG/DG i 19-26% dla PL.

Wpływ doświadczalnie wywołanego niedoboru lub nadmiaru hormonów tarczycy na profil lipidowy szczurów

1. Stężenie KT i TG w surowicy krwi oraz zawartość TG w mięśniu płaszczkowatym u szczurów w stanie niedoboru lub nadmiaru hormonów tarczycy

Średnie wartości stężenia niezestryfikowanych KT w surowicy krwi szczurów kontrolnych eutyroidalnych (**K**) oraz u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (**THY+PTU**) lub nadmiarem trijodotyroniny (**T3**) przedstawiono w Tabeli 7. Zarówno u zwierząt z grupy **THY+PTU**, jak i z grupy **T3** stężenie WKT w surowicy krwi było podwyższone ($p < 0,001$) w porównaniu do wartości stwierdzonych u grupy kontrolnej, natomiast stężenie krążących we krwi TG było nieznacznie lecz statystycznie istotnie obniżone zarówno w grupie **THY+PTU** jak i w grupie **T3** ($p < 0,05$) (Tab. 7).

Zawartość TG w mięśniu płaszczkowatym szczurów z grupy **THY+PTU** była zbliżona do wartości kontrolnych a u szczurów z nadmiarem T_3 wewnątrzmięśniowe stężenie TG było nieznacznie lecz istotnie wyższe ($p < 0,05$) od wartości kontrolnych (Tab. 7).

TABELA 7

Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) i triacylogliceroli (TG) w surowicy krwi oraz zawartość triacylogliceroli (TG_m) w mięśniu płaszczkowatym u szczurów: kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz z nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3).

	K	THY+PTU	T3
KT	0,505 ± 0,020 (n= 16)	*** 0,678 ± 0,020 (n= 15)	*** 0,663 ± 0,022 (n= 18)
TG	1,20 ± 0,04 (n= 37)	*** 0,96 ± 0,04 (n= 18)	** 1,03 ± 0,06 (n= 17)
TG_m	9,46 ± 0,27 (n= 21)	9,77 ± 0,38 (n= 11)	*** 10,94 ± 0,34 (n= 18)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz liczbę zwierząt (n).

Stężenie WKT i TG wyrażono w mmolach/l, natomiast TG_m w μmolach/g mokrej tkanki.

Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla badanych grup zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2. Wpływ niedoboru lub nadmiaru hormonów tarczycy na wychwyty i metabolizm kwasu palmitynowego w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym

U zwierząt z grupy THY+PTU wartości tempa wychwyty KP przez inkubowany mięsień płaszczkowaty w zależności od stężenia KP w medium inkubacyjnym były zbliżone do stwierdzanych w grupie kontrolnej (Tab. 8).

Trzydniowa iniekcja T₃ spowodowała natomiast znaczne zwiększenie tempa wychwyty KP przy wszystkich stosowanych jego stężeniach o ok. 40 % przy 0,5 mM (p<0,001), o 20% przy 1,0 mM (p<0,05) i o 30% przy 1,5 mM (p<0,001) w porównaniu z kontrolą (Tab. 8).

TABELA 8

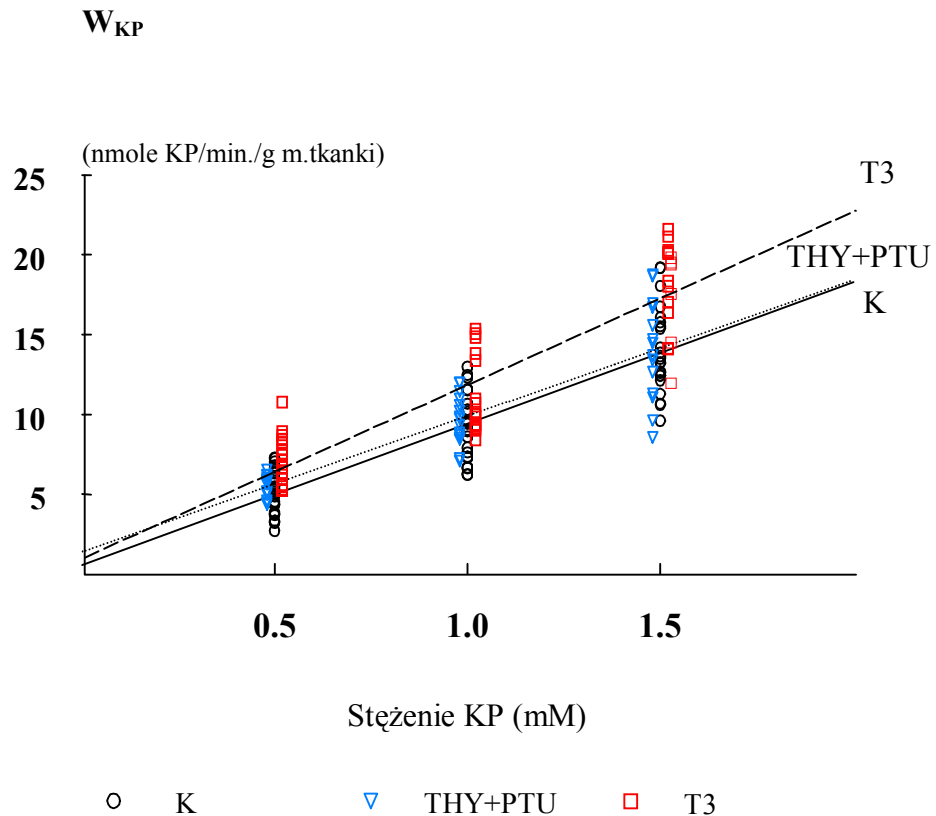
Tempo wychwyty kwasu palmitynowego (W_{KP}) przez mięsień płaszczkowaty inkubowany w obecności 0,221 mM albuminy oraz różnych stężeń KP (0,5-1,5 mM) u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) lub z nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T₃).

Grupa	Stężenie KP (mM)		
	0,5	1,0	1,5
	W _{KP} (nmole KP/min./g m. tkanki)		
K	5,09 ± 0,25 (n= 29)	9,29 ± 0,38 (n= 27)	13,95 ± 0,53 (n= 24)
THY+PTU	5,51 ± 0,16 (n= 17)	9,66 ± 0,40 (n= 15)	14,02 ± 0,85 (n= 14)
T₃	*** 7,12 ± 0,34 (n= 20)	* + + + 11,17 ± 0,61 (n= 16)	*** + + + ▲ ▲ ▲ 18,01 ± 0,65 (n= 18)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz liczbę próbek mięśni (n). Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanym dla różnych stężeń KP w roztworze inkubacyjnym w danej grupie zwierząt oznaczono: krzyżykami (+) dla różnic w porównaniu do stężenia 0,5 mM oraz trójkątami (▲) dla różnic pomiędzy stężeniami 1,0 i 1,5 mM. (+ + + p< 0,001; ▲ ▲ ▲ p<0,001). Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla badanych grup zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. (*p<0,05; ***p<0,001).

Analiza regresji wykazała istnienie liniowej współzależności pomiędzy tempem wychwytu kwasu palmitynowego przez mięsień płaszczkowaty a stężeniem tego kwasu we wszystkich badanych grupach, uzyskano przy tym podobnie wysokie współczynniki korelacji (Ryc. 9).

Wartość średnia współczynnika a , świadczącego o tempie przyrostu danego procesu w grupie **THY+PTU** była podobna do wartości kontrolnej (NS), natomiast u szczurów z grupy **T3** była istotnie wyższa niż w grupach **K** i **THY+PTU** ($p < 0,05$) (Ryc.9).



K $y = 8,845 x + 0,598$; $r = 0,878^{**}$ (n = 80)

THY+PTU $y = 8,504 x + 1,223$; $r = 0,875^{**}$ (n = 46)

T3 $y = 10,846 x + 1,304$; $r = 0,892^{**}$ (n = 54)

Ryc. 9

Współzależność pomiędzy tempem wychwytu KP przez mięsień płaszczkowaty a całkowitym stężeniem KP w mieszaninie inkubacyjnej u szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) lub nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3).

Podano równania regresji, współczynnik korelacji (r) oraz ilość próbek mięśni (n). Gwiazdkami ($**$) oznaczono statystycznie istotne wartości współczynnika r przy $p < 0,01$.

U zwierząt z doświadczalnie wywołaną niedoczynnością tarczycy (THY+PTU) tempo utleniania KP przez inkubowany mięsień płaszczkowy nie różniło się istotnie od wartości stwierdzanych u zwierząt kontrolnych (Tab. 9).

TABELA 9

Tempo utleniania kwasu palmitynowego do dwutlenku węgla (CO₂) przez mięsień płaszczkowy inkubowany w obecności 0,221 mM albuminy oraz różnych stężeń KP (0,5-1,5 mM) u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) lub nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3).

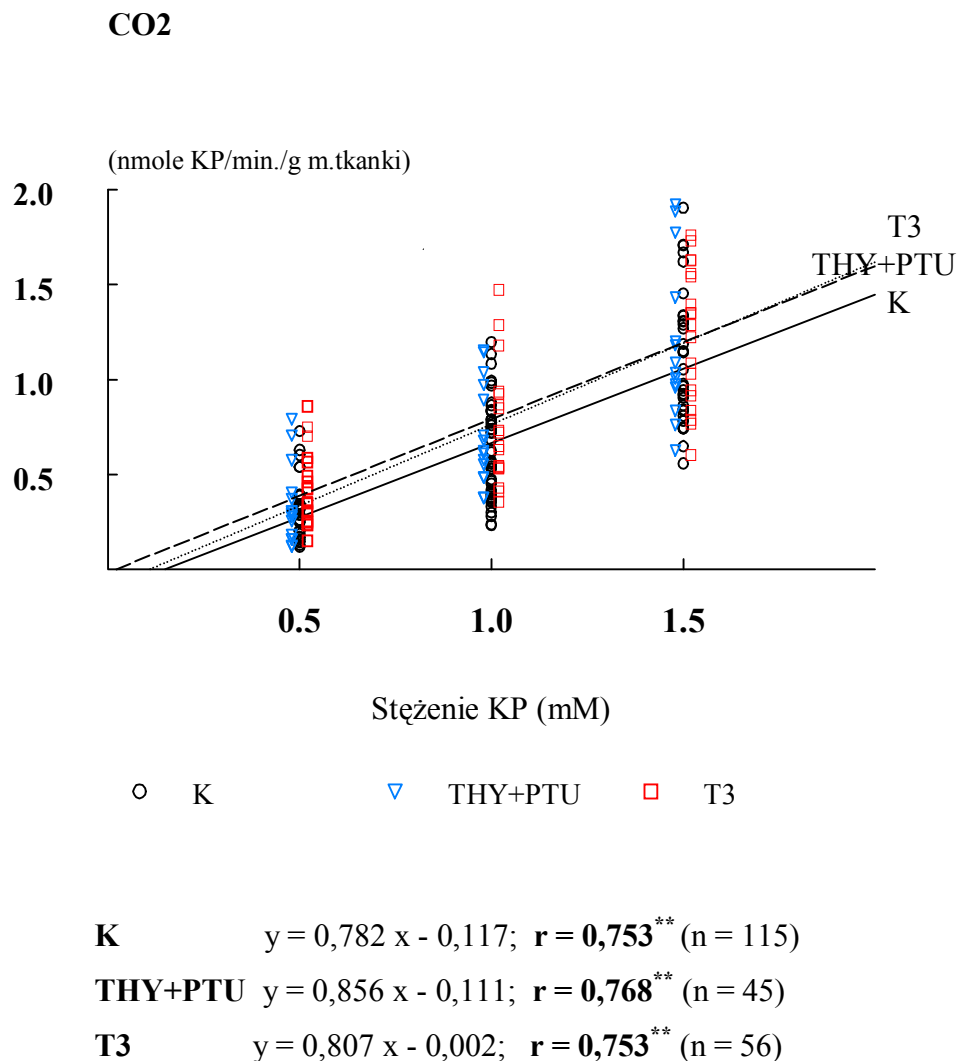
Grupa	Stężenie KP (mM)		
	0,5	1,0	1,5
	CO ₂ (nmole KP/min./g m. tkanki)		
K	0,310 ± 0,028 (n= 31)	+++ 0,618 ± 0,037 (n= 47)	+++ ▲ ▲ ▲ 1,086 ± 0,055 (n= 37)
THY+PTU	0,333 ± 0,050 (n= 16)	+++ 0,713 ± 0,068 (n= 15)	+++ ▲ ▲ 1,191 ± 0,110 (n= 14)
T3	* 0,426 ± 0,044 (n= 19)	++ 0,756 ± 0,074 (n= 18)	+++ ▲ ▲ ▲ 1,232 ± 0,082 (n= 19)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz liczbę próbek mięśni (n). Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanym dla różnych stężeń KP w roztworze inkubacyjnym w danej grupie zwierząt oznaczono: krzyżykami (+) dla różnic w porównaniu do stężenia 0,5 mM oraz trójkątami (▲) dla różnic pomiędzy stężeniami 1,0 i 1,5 mM. (+ + + p< 0,001; ▲ ▲ p<0,001; ▲ ▲ ▲ p<0,001). Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla badanych grup zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. (*p<0,05).

W grupie szczurów z nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3) tempo utleniania KP przy 0,5 mM KP było o około 37% wyższe (p<0,05) w stosunku do wartości kontrolnych. Przy wyższych stężeniach tego kwasu w mieszaninie inkubacyjnej (1,0 i 1,5 mM) tempo produkcji CO₂ przez mięsień płaszczkowy było wprawdzie nieco wyższe od wartości kontrolnych, ale różnice nie były istotne statystycznie (Tab. 9).

Analiza regresji uzyskanych wyników wykazała istnienie liniowej współzależności pomiędzy tempem utleniania kwasu palmitynowego a jego stężeniem w medium inkubacyjnym we wszystkich badanych grupach szczurów (Ryc. 10).

Tempo przyrostu badanego wskaźnika, ocenione na podstawie współczynników **a** było podobne we wszystkich grupach zwierząt (Ryc. 10).



Ryc. 10

Współzależność pomiędzy tempem utleniania KP a jego całkowitym stężeniem w mieszaninie inkubacyjnej u szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) lub nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3).

Podano równania regresji, współczynnik korelacji (**r**) oraz ilość próbek mięśni (n). Gwiazdkami (**) oznaczono statystycznie istotne wartości współczynnika **r** przy $p < 0,01$.

Tempo syntezy wewnątrzmięśniowych TG przy stężeniach KP 0,5 i 1,0 mM było u szczurów z grupy THY+PTU istotnie ($p < 0,01$) podwyższone (odpowiednio o ok. 24% i 17%) w porównaniu do wartości kontrolnych. Przy maksymalnym zastosowanym stężeniu KP (1,5 mM) następowało jakoby wysycenie procesu o czym świadczy to, że

tempo syntezy TG było w tych warunkach zbliżone do stwierdzonego przy stężeniu 1,0 mM (Tab. 10).

U zwierząt z grupy T3 tempo wbudowywania KP w pulę TG wewnątrzmięśniowych było podwyższone już w obecności 0,5 mM tego kwasu w medium inkubacyjnym, poczym wzrastało liniowo do $9,14 \pm 0,40$ przy 1,5 mM (Tab. 10). Wszystkie wartości były w tych warunkach istotnie wyższe od stwierdzonych u zwierząt kontrolnych o ok. 49 % ($p < 0,001$) przy 0,5 mM, o 25 % ($p < 0,001$) przy 1,0 mM i o 30 % ($p < 0,01$) przy 1,5 mM (Tab. 10).

TABELA 10

Tempo wbudowywania KP do triacylogliceroli (TG) przez mięsień płaszczkowy inkubowany w obecności 0,221 mM albuminy oraz różnych stężeń KP (0,5-1,5 mM) u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) lub nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3).

Grupa	Stężenie KP (mM)		
	0,5	1,0	1,5
	TG (nmole KP/min./g m. tkanki)		
K	$2,47 \pm 0,13$ (n= 45)	$4,90 \pm 0,19$ (n= 53)	$6,98 \pm 0,23$ (n= 49)
THY+PTU	** $3,06 \pm 0,14$ (n= 29)	**+++ $5,75 \pm 0,23$ (n= 28)	*+++ $5,97 \pm 0,40$ (n= 26)
T3	*** $3,67 \pm 0,16$ (n= 20)	**+++ $6,11 \pm 0,31$ (n= 18)	***+++▲▲▲ $9,14 \pm 0,40$ (n= 19)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz liczbę próbek mięśni (n).

Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanym dla różnych stężeń KP w roztworze inkubacyjnym w danej grupie zwierząt oznaczono: krzyżykami (+) dla różnic w porównaniu do stężenia 0,5 mM oraz trójkątami (▲) dla różnic pomiędzy stężeniami 1,0 i 1,5 mM. (+++ $p < 0,001$; ▲▲▲ $p < 0,001$). Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla badanych grup zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

U szczurów z grupy **THY+PTU** tempo wbudowywania kwasu palmitynowego w pulę MG/DG w obecności 0,5 i 1,5 mM KP miało tendencję do osiągania wartości niższych od kontrolnych (NS) a przy 1,0 mM było zbliżone do kontroli. Co więcej, w tej grupie zwierząt nie stwierdzono różnicy we wbudowywaniu się kwasu palmitynowego w pulę MG/DG pomiędzy stężeniem KP 1,0 i 1,5 mM (Tab. 11), co może świadczyć o tendencji do wysycania się tego systemu.

Nadmiar T_3 we krwi spowodował znaczące podwyższenie tempa wbudowywania KP w pulę MG/DG (od około 38-45%) przy wszystkich stosowanych stężeniach tego kwasu w roztworze (0,5 mM, $p < 0,001$; 1,0 i 1,5 mM, $p < 0,05$) w porównaniu do wartości uzyskanych w grupie K (Tab. 11).

TABELA 11

Tempo wbudowywania KP do mono- i diacylogliceroli (MG/DG) przez mięsień płaszczkowy inkubowany w obecności 0,221 mM albuminy oraz różnych stężeń KP (0,5-1,5 mM) u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) lub nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3).

Grupa	Stężenie KP (mM)		
	0,5	1,0	1,5
	MG/DG (nmole KP/min./g m. tkanki)		
K	0,546 ± 0,031 (n= 25)	+++ 0,895 ± 0,053 (n= 24)	+++ ▲ 1,106 ± 0,074 (n= 23)
THY+PTU	0,495 ± 0,045 (n= 12)	++ 0,843 ± 0,076 (n= 10)	++ 0,814 ± 0,100 (n= 11)
T3	*** 0,793 ± 0,054 (n= 7)	* +++ 1,253 ± 0,161 (n= 7)	* +++ 1,521 ± 0,150 (n= 7)

Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz liczbę zwierząt (n). Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanym dla różnych stężeń KP w roztworze inkubacyjnym w danej grupie zwierząt oznaczono: krzyżykami (+) dla różnic w porównaniu do stężenia 0,5 mM oraz trójkątami (▲) dla różnic pomiędzy stężeniami 1,0 i 1,5 mM. (++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; ▲ $p < 0,05$). Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla badanych grup zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Tempo wbudowywania kwasu palmitynowego w fosfolipidy (PL) w zależności od stężenia KP w mieszaninie inkubacyjnej u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) było zbliżone do wartości kontrolnych i wzrastało również podobnie wraz ze wzrostem stężenia KP w medium (Tab. 12). W tej grupie statystycznie istotne przyrosty ($p < 0,001$) uzyskano pomiędzy stężeniami 0,5 i 1,0 mM (o 84 %) oraz 0,5 i 1,5 mM (o 126 %) (Tab. 12).

Trzydniowa iniekcja T_3 spowodowała podwyższenie tempa syntezy PL w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym w porównaniu z wartościami kontrolnymi przy wszystkich stosowanych stężeniach KP, lecz istotne statystycznie ($p < 0,01$) okazały się tylko różnice przy stężeniach KP 0,5 i 1,5 mM. Wynosiły one odpowiednio ok. 53% i 64 % (Tab. 12).

TABELA 12

Tempo wbudowywania KP w fosfolipidy (PL) przez mięsień płaszczkowaty inkubowany w obecności 0,221 mM albuminy oraz różnych stężeń KP (0,5-1,5 mM) u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) oraz z nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T_3).

Grupa	Stężenie KP (mM)		
	0,5	1,0	1,5
	PL (nmole KP/min./g m. tkanki)		
K	1,21 ± 0,09 (n= 20)	+++ 1,89 ± 0,12 (n= 18)	+++ ▲ 2,46 ± 0,25 (n= 15)
THY+PTU	1,02 ± 0,08 (n= 12)	+++ 1,88 ± 0,16 (n= 13)	+++ 2,31 ± 0,22 (n= 12)
T3	** 1,85 ± 0,18 (n= 6)	2,18 ± 0,19 (n= 6)	** +++ ▲▲▲ 4,04 ± 0,25 (n= 6)

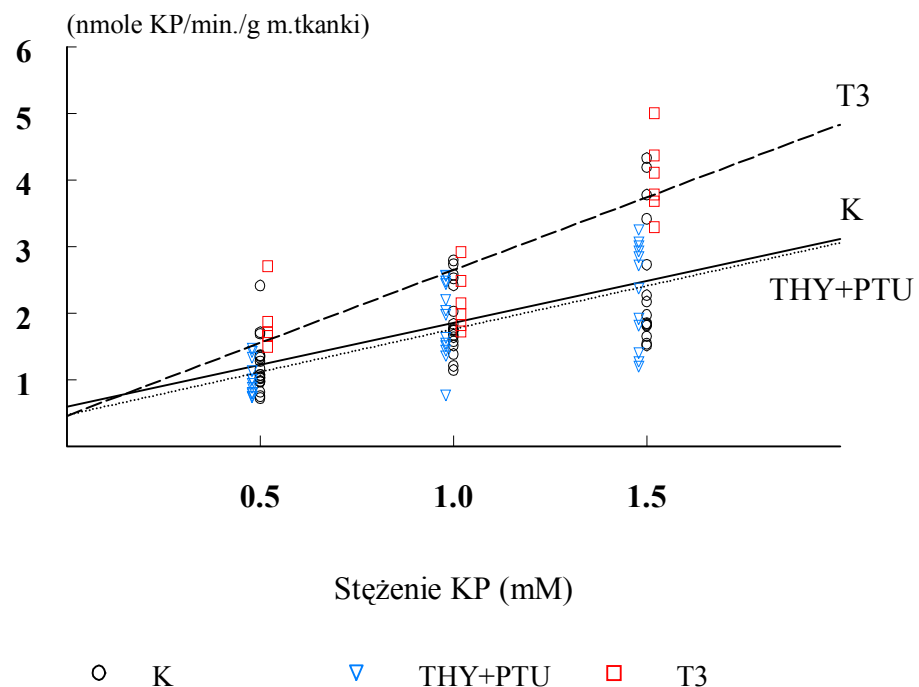
Podano średnią arytmetyczną, błąd standardowy oraz liczbę zwierząt (n).

Statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla różnych stężeń KP w roztworze inkubacyjnym w danej grupie zwierząt oznaczono: krzyżykami (+) dla różnic w porównaniu do stężenia 0,5 mM oraz trójkątami (▲) dla różnic pomiędzy stężeniami 1,0 i 1,5 mM. (+++ $p < 0,001$; ▲ $p < 0,05$; ▲▲▲ $p < 0,001$). Gwiazdkami (*) oznaczono statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi dla badanych grup zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. (** $p < 0,001$).

W każdej z grup zwierząt uzyskano istotne współczynniki korelacji dla współzależności pomiędzy stężeniem kwasu palmitynowego w buforze a tempem jego wbudowywania w fosfolipidy, przy czym współzależność ta była najsilniej wyrażona u szczurów z grupy T3 (Ryc.11).

W grupie THY+PTU tempo przyrostu badanego wskaźnika było podobne do stwierdzonego w grupie kontrolnej. U zwierząt z nadmiarem T₃ średni współczynnik a równań regresji był natomiast istotnie wyższy w porównaniu do wartości kontrolnej (p<0,05).

PL



$$\text{K} \quad y = 1,259 x + 0,595; \quad r = 0,629^{**} \quad (n = 53)$$

$$\text{THY+PTU} \quad y = 1,294 x + 0,448; \quad r = 0,687^{**} \quad (n = 37)$$

$$\text{T3} \quad y = 2,189 x + 0,501; \quad r = 0,837^{**} \quad (n = 18)$$

Ryc. 11

Współzależność pomiędzy tempem wbudowywania KP w PL a jego całkowitym stężeniem w mieszaninie inkubacyjnej u szczurów kontrolnych (K), z niedoborem hormonów tarczycy (THY+PTU) lub nadmiarem trijodotyroniny we krwi (T3).

Podano równania regresji, współczynnik korelacji (*r*) oraz ilość próbek (*n*). Gwiazdkami (**) oznaczono statystycznie istotne wartości współczynnika *r* przy *p*<0,01.

Pomimo różnic w tempie wbudowywania KP w pule triacylogliceroli, mono- i diacylogliceroli oraz fosfolipidów pomiędzy grupami o różnym stanie czynnościowym tarczycy udział procentowy KP w tych frakcjach był podobny u wszystkich badanych zwierząt i wynosił 56-66% dla TG, 9-14% dla MG/DG oraz 24-32% dla PL. Poza tym we wszystkich badanych grupach udział procentowy KP w poszczególnych frakcjach lipidowych nie zależał od stężenia KP w mieszaninie inkubacyjnej.

Objętość przestrzeni pozakomórkowej inkubowanego mięśnia płaszczkowatego w grupie **THY+PTU** nie różniła się istotnie od wartości kontrolnej ($214,9 \pm 9,0$ $\mu\text{l/g}$ m. tkanki; $n = 23$) i wynosiła $236,4 \pm 9,8$ $\mu\text{l/g}$ m. tkanki ($n = 16$). U szczurów z nadmiarem T_3 obserwowano natomiast tendencję do wzrostu badanego wskaźnika ($245,3 \pm 11,6$ $\mu\text{l/g}$ m. tkanki; $n = 12$).

6. DYSKUSJA

Ocena zastosowanej techniki

Inkubację mięśnia płaszczkowatego w buforze Krebsa-Ringera zawierającym albuminę i glukozę stosowano dotychczas w naszym Zakładzie do badań *in vitro* nad tempem metabolizmu glukozy w mięśniach szkieletowych oraz ich wrażliwością na insulinę (Budohoski i wsp. 1993, 1987, 1984; Dubaniewicz i wsp. 1989; Langfort i wsp. 1993, 1991). W celu przystosowania tego modelu do badań nad wychwytem i metabolizmem kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych szczura, do mieszaniny inkubacyjnej oprócz glukozy, dodano kwas palmitynowy związany z albuminą bydlęcą. Ze względu na to, że kompleks kwas palmitynowy-albumina jest znacznie większą cząsteczką niż glukoza, pojawiły się wątpliwości czy, a jeśli tak to w jakim stopniu może ona dyfundować z medium inkubacyjnego do wnętrza skrawka mięśnia płaszczkowatego. W celu wyjaśnienia tych wątpliwości zidentyfikowano kompleks albumina-KP w preparacie z inkubowanego mięśnia, używając monoklonalnych przeciwciał przeciw albuminie z krwi bydlęcej i peroksydazie przeciwko mysim IgG. Wykazano, że pomimo swojej wielkości cząsteczka albuminy penetruje do wnętrza inkubowanego mięśnia. Polega to prawdopodobnie na dyfuzji poprzez przestrzeń pozakomórkową przyległych tkanek, ponieważ światło naczyń krwionośnych nie było silniej wybarwione niż pozostałe fragmenty skrawka mięśnia. W dodatkowych doświadczeniach stwierdzono ponadto, że niezależnie od wielkości fragmentu mięśnia wbudowywanie KP do TG wewnątrzmięśniowych oraz jego utlenianie do CO₂ w przeliczeniu na gram tkanki było stałe, co również pośrednio potwierdza, że KP dociera do wnętrza skrawka mięśnia płaszczkowatego.

Stwierdzono także, że w ciągu 30 minut inkubacji (poprzedzonej 15 min. pre-inkubacją) żywotność mięśnia pozostaje niezmienną, ponieważ jego potencjał energetyczny (ECP) i zawartość wysokoenergetycznych fosforanów w mięśniu nie różniła się istotnie od wartości kontrolnych. Dyck i wsp. (1997), którzy oceniali metabolizm KP w izolowanym mięśniu płaszczkowatym prowadzili doświadczenia aż do 3 godzin, lecz aby utrzymać stałe stężenie związków wysokoenergetycznych obniżali temperaturę inkubacji z 37°C do 30°C. Inni badacze, którzy inkubowali różne mięśnie szkieletowe (m. płaszczkowaty, m.zginacz palców krótki, m. czworogłowy uda) i mięśnie przepony w 37°C przez 90 min (Glatz i Veerkamp 1982) i 120 min (Okano i Shimojo 1982), nie oznaczali jednak zawartości w nich wysokoenergetycznych fosforanów w tym okresie.

W badaniach własnych dotyczących metodycznych aspektów badań wykazano, że dodanie do mieszaniny inkubacyjnej glukozy w stężeniu fizjologicznym (5,5 mM) zwiększało o ok. 68% tempo wbudowywania KP w pulę triacylogliceroli wewnątrzmięśniowych. Wynik ten, zgodny z danymi uzyskanymi przez innych autorów (Eaton i Steinberg 1961, Glatz i Veerkamp 1982), potwierdza więc, że egzogenna glukoza jest ważnym prekursorem do syntezy glicerolo-3-fosforanu w mięśniach szkieletowych, związku niezbędnego do syntezy acylogliceroli i fosfolipidów *de novo*.

Podobnie do wyników opisanych we wcześniejszych pracach (Eaton i Steinberg 1961, Glatz i Veerkamp 1982) również w doświadczeniach własnych stwierdzono, że pod wpływem fizjologicznego stężenia glukozy nie zmienia się tempo utleniania KP do CO₂.

W dalszej części badań zmierzających do oceny zastosowanej metody *in vitro* wykazano podobnie do wyników Dyck'a i wsp. (1997) liniową zależność pomiędzy czasem trwania inkubacji a wychwytem KP z mieszaniny inkubacyjnej oraz jego utlenianiem do CO₂ i wbudowywaniem w lipidy wewnątrzmięśniowe (TG, PL, MG/DG).

Stwierdzono ponadto, że tempo wychwytu KP, tempo jego utleniania do CO₂ oraz tempo wbudowywania do TG, PL i DG/MG przez izolowany mięsień płaszczkowaty wzrasta wraz ze zwiększaniem całkowitego stężenia tego kwasu w mieszaninie inkubacyjnej (od 0,5 do 1,5 mM). Jest to zgodne z wynikami kilku zaledwie prac innych autorów, którzy badali wychwyt i metabolizm kwasów tłuszczowych w tym mięśniu *in vitro* (Dyck i wsp. 1997, Dyck i Bonen 1998, Alm i Saggerson 1998).

W badaniach własnych utlenianie KP przez mięsień płaszczkowaty *in vitro*, oceniane na podstawie tempa produkcji CO₂ stanowiło 3-8,5% całkowitego wychwytu KP przez ten mięsień. W pracy Dyck'a i wsp. z roku 1997 podano, że izolowany mięsień płaszczkowaty w spoczynku utlenia aż ok. 60% wychwyconego kwasu palmitynowego. W innych doświadczeniach tej samej grupy badaczy utlenianie KP przez mięsień płaszczkowaty w spoczynku stanowiło jedynie ok. 25% (Dyck i Bonen 1998) a nawet tylko ok. 17% (Dyck i wsp. 2001) całkowitego wychwytu. Nie wyjaśniono jednak przyczyn tych rozbieżności. W przytoczonych badaniach utlenianie KP mierzono podobnie jak w obecnej pracy na podstawie pomiaru produkcji ¹⁴CO₂, lecz uwzględniano także piętno izotopowe w produktach pośrednich procesu β-oksydacji i cyklu Krebsa rozpuszczalnych w wodzie takich jak acetyloCoA, α-

ketoglutaran czy szczawiooctan (Sidossis i wsp. 1995). Poprzednio wykazano, że radioaktywność produktów pośrednich zależy od miejsca znakowania atomu węgla w łańcuchu węglowym (Glatz i Veerkamp 1982). Przy wykorzystywaniu $1\text{-}^{14}\text{C}$ -KP stężenie produktów pośrednich w inkubowanym mięśniu stanowiło ok. 50% całkowitego utleniania KP tzn. sumy CO_2 i produktów pośrednich (Glatz i Veerkamp 1982, Dyck i wsp. 2001). Podobne podejście zaprezentowali również Sidossis i wsp. (1995), oceniając utlenianie KP do CO_2 w warunkach *in vivo*. W przypadku uwzględnienia stężenia produktów pośrednich w badaniach własnych okazałoby się, że utlenianie KP do CO_2 osiągnęłoby do ok. 17% całkowitego wychwytu KP przez mięsień płaszczkowaty, byłoby więc zbliżone do wyników ostatnio opublikowanych prac Dyck'a i wsp. (2001).

Oceniając w obecnej pracy udział KP w poszczególnych frakcjach lipidowych wyekstrahowanych z mięśnia i rozdzielanych techniką chromatografii cienkowarstwowej stwierdzono, że najwięcej tego kwasu wbudowuje się w TG, następnie w PL, najmniej zaś we frakcje MG/DG. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym przez Petersa i wsp. (1998), Dyck'a i Bonena (1998) oraz Dyck'a i wsp. (2000). Wyniki badań *in vitro* pokrywają się także z uzyskanymi *in vivo* po dożylniej iniekcji znakowanego KP (Gorski i Bonen 1997). W modelu tym 50% KP wbudowywało się w TG, 32 % w PL a 13 % w MG/DG.

W badaniach prezentowanej pracy wykazano, że wraz z przedłużaniem się czasu inkubacji powyżej 10 min zmniejsza się procentowy udział KP we frakcji MG/DG, natomiast wzrasta we frakcji TG, pozostając w miarę stały we frakcji PL. Podobne obserwacje poczynili Chen i wsp. (1994), badając wbudowywanie glukozy we frakcje lipidowe w mięśniu płaszczkowatym w czasie 10, 20 i 30 min inkubacji.

Na uwagę zasługuje stwierdzenie w obecnej pracy podobnego procentowego udziału KP w poszczególnych frakcjach lipidów pomimo zróżnicowania stężenia KP w mieszaninie inkubacyjnej.

W inkubowanym mięśniu płaszczkowatym oznaczono przestrzeń pozakomórkową wykazując, że niezestryfikowany KP z tego mięśnia pochodzi raczej z tej przestrzeni nie zaś z wnętrza włókien mięśniowych. Z tego względu stężenie wewnątrzmięśniowych KT przynajmniej w tych warunkach doświadczalnych okazało się niemierzalne.

Przestrzeń pozakomórkową w inkubowanym mięśniu mierzono stosując podobnie jak inni autorzy (Cieslar i wsp. 1998) znakowaną inulinę. Jest ona

wielocukrem powszechnie stosowanym do tego celu, gdyż ze względu na dużą masę cząsteczkową nie wnika do komórki. Jak wykazano w obecnej pracy przestrzeń pozakomórkowa mięśnia płaszczkowatego wynosi średnio $214,9 \pm 9,0 \mu\text{l/g}$ mokrej tkanki, stanowi zatem ok.20% całkowitej masy mięśnia. Według Kandarian'a i wsp. (1991) przestrzeń pozakomórkowa mięśnia płaszczkowatego *in vitro* stanowi ok. 17% całkowitej masy mięśnia.

Wychwyty i metabolizm KP w mięśniu płaszczkowatym w zależności od stężenia tego kwasu w puli związanej i niezwiązanej z albuminą.

Jak omówiono szerzej we Wstępie we krwi obecne są dwie pule kwasów tłuszczowych: związana i nie związana z albuminą (Richieri i wsp.1993). Wielkość tej drugiej puli zależy od stosunku stężeń kwasów tłuszczowych do albuminy (v) (Richieri i wsp. 1993). Pomimo, że Glatz i Veerkamp już w 1982 r. sugerowali, że wychwyty i utlenianie KT wzrastają wraz ze wzrostem zarówno całkowitego stężenia KT we krwi jak i stosunku stężeń KT do albuminy, od kilku lat przedmiotem ożywionej dyskusji stał się ponownie problem, która z tych frakcji odgrywa bardziej istotną rolę w wewnątrzkomórkowym metabolizmie KT. W piśmiennictwie spotkać można na ten temat dwie przeciwstawne koncepcje i tak wg jednej grupy badaczy (Rose i wsp. 1990; Kvilekval i wsp. 1994) tempo wychwyty KT przez izolowane kardiomiocyty i hepatocyty wzrasta wraz ze wzrostem stężenia niezwiązanych z albuminą KT (nKT), natomiast nie zmienia się gdy stężenie nKT jest stałe a wzrasta całkowite stężenie kwasów tłuszczowych. Oznaczałoby to, że w wychwycie KT bierze udział jedynie pula nKT, natomiast kwasy tłuszczowe związane z albuminą pełnią tylko funkcję rezerwy uzupełniającej pulę nKT.

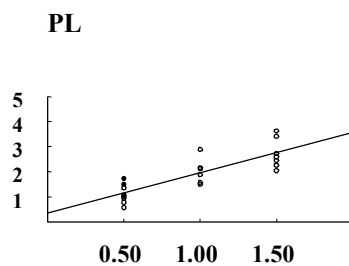
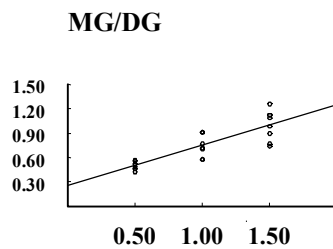
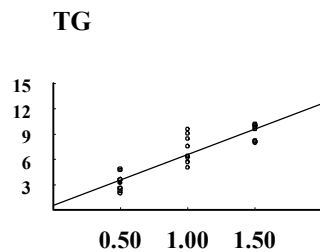
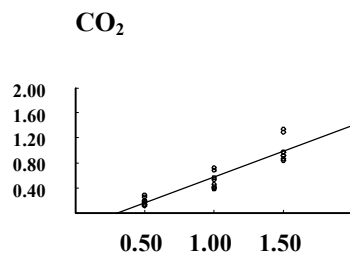
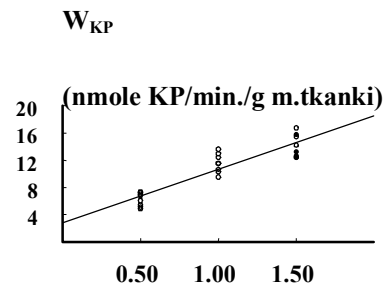
Przeciwny pogląd reprezentuje inna grupa uczonych (Weisiger i wsp. 1981; Hutter i wsp. 1984; Rauch i wsp. 1987; Trigatti i Gerber 1995). Na podstawie badań hepatocytów, adipocytów i kardiomiocytów stwierdzili oni, że pomimo zachowania stałego stosunku stężenia kwasów tłuszczowych do albuminy (v), tempo wychwyty KT przez tkanki wzrasta wraz ze wzrostem całkowitego stężenia tych kwasów. Te wyniki mogą sugerować, że to pula KT związana z albuminą odgrywa decydującą rolę w wychwycie KT. Zaproponowano także, że uwolnienie KT od kompleksu albumina-KT mogą ułatwiać białka wiążące albuminę (ABP) (Schnitzner i Oh 1994, Burczynski i Cai 1994), które odkryto w błonie komórkowej śródbłonna naczyń kapilarnych (Antohe i wsp. 1993) oraz w błonie komórkowej miocytów, adipocytów i hepatocytów (Schnitzner i Oh 1992).

W badaniach własnych wychwyty i wewnątrzmięśniowy metabolizm KP oceniono zarówno przy wzrastającym jak i stałym stężeniu nKP, zmieniając stosunek stężenia KP do albuminy.

Wykazano (Ryc. 12), że tempo wszystkich ocenianych procesów w mięśniu płaszczkowatym inkubowanym w obecności wzrastającego stosunku stężeń molarnych KP i albuminy (grupa W) wykazuje liniową zależność od całkowitego stężenia KP, natomiast gdy odniesiono te same wyniki do wyliczonego stężenia nKP kinetyka tych procesów miała przebieg wysycający się (Górecka i wsp. 2001). Wynik ten jest więc zgodny z tym co przedstawili w swoich pracach Turcotte i wsp. (1991), badając wychwyty kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe perfundowanej kończyny tylnej szczura oraz Bonen i wsp. (1998a), którzy podobnie jak w obecnej pracy stosowali model *in vitro*.

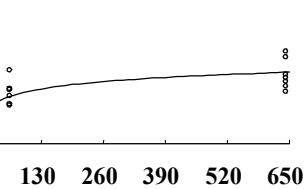
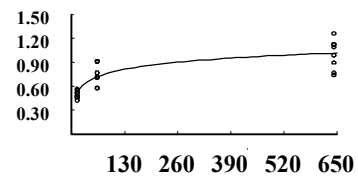
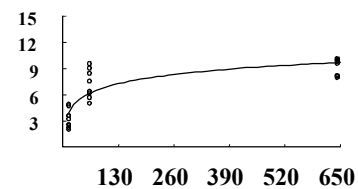
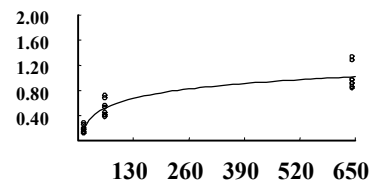
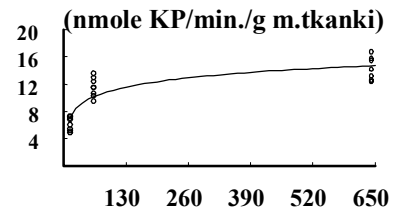
W przypadku, gdy stężenie frakcji nKP utrzymywano na stałym poziomie tempo badanych procesów wykazywało także liniową zależność od całkowitego stężenia kwasu palmitynowego w mieszaninie inkubacyjnej. Należy jednak podkreślić, że tempo zmian tych procesów było w tych warunkach znacznie wolniejsze niż wtedy gdy jednocześnie wzrastało stężenie nKP w medium inkubacyjnym. Uzyskane wyniki świadczą więc, że przynajmniej w warunkach *in vitro*, wychwyty i metabolizm KP w komórce mięśniowej zależą zarówno od wielkości kompleksu KP-albumina jak i od stężenia nKP.

A.



Stężenie KP (mM)

B.



Stężenie nKP (nM)

Ryc. 12

Współzależność pomiędzy wychwytem kwasu palmitynowego (W_{KP}) przez mięsień płaszczkowy, jego utlenianiem do CO_2 oraz wbudowywaniem w triacyloglicerole (TG), mono- i diacyloglicerole (MG/DG) i fosfolipidy (PL) a stężeniem kwasu palmitynowego związanego [A.] i niezwiązanego z albuminą [B.]

Wpływ doświadczalnie wywołanego niedoboru lub nadmiaru hormonów tarczycy na profil lipidowy szczurów.

Hormony tarczycy, zwłaszcza trijodotyronina (T_3) odgrywają kluczową rolę w procesach wzrostu, rozwoju oraz kontroli przemiany materii. Są więc one niezbędne dla normalnego funkcjonowania prawie wszystkich tkanek, przy czym w dorosłych organizmach najlepiej poznano ich modyfikujący wpływ na podstawową przemianę materii, metabolizm węglowodanów, wielkość zasobów lipidowych w ustroju oraz procesy lipogenezy i lipolizy (patrz: Yen 2001, Gong i wsp. 1997, Jekabsons i wsp. 1999, Oppenheimer i wsp. 1991, Dimitriadis i wsp. 1997, Dubaniewicz i wsp. 1989).

W prezentowanej pracy podjęto próbę sprawdzenia czy i w jaki sposób doświadczalnie wywołany niedobór hormonów tarczycy lub ich krótkotrwały nadmiar u szczurów wpływają na "losy" kwasów tłuszczowych w mięśniu płaszczkowatym *in vitro* i czy zachodzące tam procesy zależą od stężenia kwasu palmitynowego w medium inkubacyjnym. Należy podkreślić, że w dostępnym piśmiennictwie znaleziono pojedyncze tylko doniesienia na ten temat.

Jak opisano w rozdziale Materiał i Metody przewlekły stan niedoboru hormonów tarczycy wywoływano u szczurów, usuwając tarczycę i podając im następnie PTU w wodzie do picia przez kilka tygodni. Model ten pozwolił uzyskać znaczne obniżenie trijodotyroniny i tyroksyny we krwi i był uprzednio stosowany nie tylko w naszym Zakładzie (Jakubiec-Puka i wsp. 1999). Krótkotrwałe podwyższenie krążących we krwi hormonów tarczycy uzyskano podając szczurom w iniekcji trijodotyroninę (T_3) przez trzy dni, w wyniku czego zarówno stężenie T_3 jak i T_4 istotnie się zwiększa (patrz: Tab. 1 w rozdziale Materiał i Metody). Podobny model doświadczalny zastosowali także Żendzian-Piotrowska i wsp. (2000).

Zmiany stężenia hormonów tarczycy we krwi znajdują swoje odzwierciedlenie w poziomie lipidów osoczowych i zawartości TG w mięśniu płaszczkowatym.

U szczurów z doświadczalnie wywołanym niedoborem hormonów tarczycy stwierdzono podwyższone stężenia KT w osoczu o ok. 34% w porównaniu z grupą kontrolną oraz obniżenie poziomu TG we krwi (o ok. 20%). Są to wyniki zbliżone do uzyskanych przez Żernicką (1999), która stosując taki sam model doświadczalny, wykazała wzrost stężenia KT w osoczu o ok. 45% i obniżenie stężenia TG we krwi do 50%. Podobne zmiany stężenia TG we krwi stwierdzono także w innych badaniach przeprowadzonych na szczurach z hipotyreozą (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1981; Popovic i wsp. 1998; Dory i Roheim 1981).

Niski poziom TG osocza u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy można by przypisywać podwyższonej w tym stanie aktywności lipazy lipoproteinowej (LPL) zarówno w tkance tłuszczowej (Saffari i wsp. 1992) jak i w mięśniach szkieletowych (Żernicka 1999; Ong i wsp. 1994; Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980), sugeruje się bowiem istnienie ujemnej korelacji pomiędzy aktywnością LPL a stężeniem TG we krwi (Popovic i wsp. 1998). Stwierdzono, że pomimo podwyższonej aktywności LPL w mięśniach szkieletowych wychwyty przez nie KT z TG chylomikronów *in vivo* nie odbiega od wartości kontrolnych (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980, Żernicka 1999). Ponadto w stanie hipotyreozy w tkance tłuszczowej obniża się tempo lipolizy a wzrasta tempo syntezy TG (Bath i Saggerson 1988), co może zmniejszać uwalnianie KT z adipocytów do krwi. Można zatem przypuszczać, że podwyższone stężenie KT we krwi u szczurów z niedoborem hormonów tarczycy mogło wynikać ze zwiększonego tempa hydrolizy TG osocza przy niezmienionym tempie ich wychwyty przez mięśnie szkieletowe.

U szczurów z krótkotrwałą hipertyreozą również obserwowano wzrost stężenia KT w surowicy krwi (o ok. 31%) i obniżenie poziom TG osocza (o ok. 14%). Obniżenie stężenia TG osocza raczej trudno wiązać z aktywnością LPL, gdyż z badań Żernickiej (1999) wynika, że u szczurów z krótkotrwale podwyższonym stężeniem hormonów tarczycy we krwi aktywność LPL w mięśniach szkieletowych ulega obniżeniu. Jest natomiast dobrze udokumentowane, że w hipertyreozie u szczurów obniża się tempo syntezy TG w hepatocytach (Wilcox i Heimberg 1991; Keyes i wsp. 1981) i zmniejsza się uwalnianie VLDL przez wątrobę (Keyes i wsp. 1981). Wydaje się więc, że podwyższone stężenie KT we krwi u tych zwierząt jest związane ze zwiększonym uwalnianiem KT z tkanki tłuszczowej (Oppenheimer i wsp. 1991), wiadomo bowiem, że pod wpływem hormonów tarczycy zwiększa się wrażliwość adipocytów na lipolityczne działanie amin katecholowych (Bilezikian i wsp. 1983).

Po usunięciu tarczycy zawartość TG w mięśniu płaszczkowatym nie ulegała zmianie w stosunku do wartości kontrolnych, natomiast podwyższenie krążących we krwi hormonów tarczycy istotnie zwiększyło ich zawartość, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Żernicką (1999). Poza tym badając w obecnej pracy wbudowywanie KP w pulę TG w mięśniu płaszczkowatym *in vitro* stwierdzono, że tempo tego procesu istotnie wzrosło po podaniu T₃.

Wpływ niedoboru i nadmiaru hormonów tarczycy na tempo wychwytu KP przez mięsień płaszczkowy *in vitro* oraz tempo utleniania i wbudowywania tego kwasu w lipidy wewnątrzmięśniowe.

W doświadczalnie wywołanym niedoborze hormonów tarczycy nie zanotowano istotnych różnic ani w tempie wychwytu, ani w tempie utleniania KP w stosunku do wartości kontrolnych. Synteza TG była istotnie zwiększona tylko w niższych stężeniach tego kwasu w medium (0,5 i 1,0 mM), natomiast wbudowywanie KP w MG/DG oraz PL nie różniło się od wartości kontrolnych. Wraz ze wzrostem stężenia KP w medium inkubacyjnym tempo wychwytu KP, jego utleniania i wbudowywania w PL miało przebieg liniowy, podobnie jak w mięśniach pobranych od zwierząt kontrolnych. W przypadku wbudowywania KP we frakcje TG oraz MG/DG obserwowano natomiast pewne "spłaszczenie" przebiegu zmian charakteryzujących zależność pomiędzy stężeniem KP w medium a tempem wbudowywania się kwasu palmitynowego w tę frakcję lipidów wewnątrzmięśniowych. Świadczyć to może o tendencji do wysycenia procesu przy wysokich stężeniach kwasu palmitynowego, podobnie do opisanego wcześniej w obecnej pracy gdy wbudowywanie KP do wewnątrzmięśniowych TG odnoszono do wyliczonej wolnej puli tego kwasu.

Obserwowane u zwierząt z niedoborem hormonów tarczycy zwiększone wbudowywanie KP w TG przy niezmienionym wychwycie KP oraz jego wbudowywaniu w pule MG/DG i PL mogłyby sugerować wpływ hormonów tarczycy na ostatni etap syntezy TG, czyli przyłączenie acyloCoA do DG katalizowane przez acylotransferazę diacyloglicerolową (DGAT). Można by także postulować, że to raczej zwiększenie aktywności DGAT a nie podwyższone stężenie acyloCoA w miocytach są przyczyną zwiększonego tempa syntezy TG. Bath i Saggerson (1988) na przykładzie adipocytów wykazali, że doświadczalnie wywołana niedoczynność tarczycy powoduje wzrost aktywności tego enzymu. Brak jest jednak danych na temat wpływu hormonów tarczycy na aktywność DGAT w mięśniach szkieletowych.

Ze względu na to, że frakcję TG ekstrahowano z całego mięśnia, w którym pomiędzy włóknami może występować także tkanka tłuszczowa nie można wykluczyć, że obserwowane zwiększone wbudowywanie KP w TG było wynikiem zwiększonej aktywności DGAT w adipocytach. U czterotygodniowych samców szczepu Wistar o masie 65-75 g nie obserwowano wprawdzie obecności tkanki tłuszczowej pomiędzy włóknami mięśniowymi w mięśniu płaszczkowym (Langfort i wsp. 1999), jednak szczury użyte w obecnej pracy były nieco starsze.

Hormony tarczycy należą do głównych czynników regulujących spoczynkową przemianę materii w organizmie. Przy ich niedoborze zmniejsza się tempo pobieranie tlenu przez organizm (Sillau 1984), zmniejsza się ilość mitochondriów w mięśniach szkieletowych (Tata i wsp. 1963), obniża się aktywność enzymów mitochondrialnych: syntetazy cytrynianowej (Baldwin i wsp. 1980), oksydazy cytochromu c (Sillau 1984), stężenie cytochromu c (Terjung i Koerner 1976). Zmniejsza się również zdolność oksydacyjna mięśnia płaszczkowatego (Baldwin i wsp. 1980, McAllister i wsp. 1995).

Stwierdzono również, że przy niedoborze hormonów tarczycy zmniejsza się w mięśniu płaszczkowatym tempo glikolizy, mierzone tempem produkcji mleczanu (Dimitriadis i wsp. 1997, Dubaniewicz i wsp. 1989). Potwierdzają to również uzyskane przeze mnie wyniki (Górecka i wsp. 1999). Na ich podstawie stwierdziłam, że tempo syntezy mleczanu w mięśniu płaszczkowatym szczurów w stanie hipotyreozy było wprawdzie niższe od wartości kontrolnych przy wszystkich zastosowanych stężeniach KP w medium inkubacyjnym, lecz istotne różnice stwierdzono tylko przy stężeniach 1,0 i 1,5 mM. Analiza regresji wykazała istnienie ujemnej współzależności pomiędzy stężeniem kwasu palmitynowego w medium inkubacyjnym a tempem produkcji mleczanu w mięśniu płaszczkowatym tych szczurów ($y = 4,298 - 0,761 x$; $r = -0,414$; $p < 0,01$; $n = 38$). U zwierząt kontrolnych stężenie KP nie wpływało natomiast na tempo produkcji mleczanu. Mogłoby to sugerować, że przy wysokim stężeniu KP w medium, znacznie zmniejszone tempo glikolizy obniżając dostępność glicero-3-fosforanu wpływa hamująco na proces wbudowywania KP we frakcje TG i MG/DG w mięśniach szkieletowych. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga jednak dalszych badań.

W warunkach podwyższonego stężenia hormonów tarczycy we krwi szczurów, które prowadzi do wzrostu pobierania tlenu i przemian oksydacyjnych w organizmie stwierdzono, że tempo utleniania KP do CO₂ przez mięsień płaszczkowaty było podwyższone przy 0,5 mM stężeniu KP w medium. Wart podkreślenia jest fakt, że nawet krótkotrwałe podwyższenie krążących we krwi hormonów tarczycy w istotny sposób zwiększało wychwyty KP i jego wbudowywanie się we frakcje TG, MG/DG i PL, zwłaszcza że stwierdzano je już przy najniższym z zastosowanych stężeń tego kwasu w medium.

Stymulujące działanie hormonów tarczycy na wychwyty kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe, tempo ich utleniania oraz wbudowywania w poszczególne frakcje lipidów wewnątrzmięśniowych określane *in vitro* opisano wg mojej wiedzy po raz pierwszy.

Wzrost wychwytu KT przez mięsień płaszczkowy w stanie doświadczalnego nadmiaru hormonów tarczycy stwierdzano jednak uprzednio w warunkach *in vivo* badając wychwyty znakowanych KT z chylomikronów przez mięsień płaszczkowy (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980; Żernicka 1999). Wykazano ponadto zwiększone utlenianie KT przez ten mięsień w tych warunkach doświadczalnych (Kaciuba-Uściłko i wsp. 1980). W niedawno opublikowanej pracy Żendzian-Piotrowska i wsp. (2000), którzy podawali szczurom T_3 przez 6 dni w dawce $10 \mu\text{g}/100 \text{ g m.c.}$ stwierdzili *in vivo* ponad dwukrotny w porównaniu z kontrolą wzrost wbudowywania znakowanego kwasu palmitynowego w fosfolipidy mięśnia płaszczkowego, zwłaszcza zaś we frakcje sfingomieliny, fosfatydyloseryny i fosfatydyloinozytolu. Ponadto Sugden i wsp. (1999), podając szczurom przez 3 dni $100 \mu\text{g } T_3/100 \text{ g m.c.}$ wykazali zwiększone utlenianie KP do CO_2 w izolowanych kardiomiocytach.

W obecnej pracy stwierdzono, że niezależnie od stężenia KP w medium tempo wychwytu tego kwasu u szczurów z nadmiarem hormonów tarczycy było o 20-30% wyższe niż u zwierząt kontrolnych. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych świadczących o wpływie trijodotyroniny na tempo transportu KT przez błonę komórkową, czy stężenie białek wiążących KT w błonie komórkowej. W mojej pracy nie zajmowałam się wpływem T_3 na mechanizmy błonowego transportu KT, lecz co wydaje się interesujące i ważne, określałam wielkość przestrzeni pozakomórkowej w mięśniu. Okazało się, że po 3-dniowym podawaniu T_3 wielkość przestrzeni pozakomórkowa mięśnia płaszczkowego miała tendencje do zwiększania się, co sprzyjać mogło zwiększeniu dostępności KT dla miocytów. Wydaje się więc, że zwiększony wychwyty KP przez mięsień płaszczkowy pobrany od szczurów z nadmiarem T_3 mógł wynikać ze zwiększonej dostępności tego kwasu oraz podwyższonego tempa jego metabolizmu w komórce.

Jak już wspomniano, tempo utleniania KP przez mięsień płaszczkowy *in vitro* u szczurów, którym podawano T_3 było o 37% wyższe niż w kontroli przy $0,5 \text{ mM KP}$ w roztworze inkubacyjnym.

Zwiększone pobieranie tlenu przez organizm stwierdzono już po 24 godz. od iniekcji T_3 (Oppenheimer i wsp. 1991). Van Hardeveld i Kassenaar (1977), podając przez 7-10 dni T_4 w dawkach $20-80 \mu\text{g}/100 \text{ g m.c.}$ wykazali ponadto w tej sytuacji, że wzrasta o 21-33% pobieranie tlenu przez kończynę tylną. Zwiększone pobieranie tlenu bezpośrednio przez mięsień płaszczkowy obserwowano także w wielu innych badaniach, w których wywoływano doświadczalnie nadmiar hormonów tarczycy (Capo

i Sillau 1983, De Luise i Harker 1989, Short i wsp. 2001). Wraz ze wzrostem pobierania tlenu podwyższała się także aktywność enzymów zaangażowanych w przemianach tlenowych: np. syntetazy cytrynianowej (Short i wsp. 2001, McAllister i wsp. 1995, Winder i Holloszy 1977, Capo i Sillau 1983), oksydazy cytochromu c (Short i wsp. 2001, Winder i Holloszy 1977, Courtright i Fitts 1979, Capo i Sillau 1983), wzrastało stężenie cytochromu c (Winder i Holloszy 1977) oraz tempo syntezy ATP (Short i wsp. 2001). Zmiany te notowano jednak dopiero przy dłuższym, co najmniej 2-6 tygodniowym podawaniu trijodotyroniny. Istnieją natomiast prace (Kubista i wsp. 1971; Winder i wsp. 1975; Winder 1979), w których zmian takich nie stwierdzano przy krótkotrwałej hipertyreozie (5-8 dni).

W odróżnieniu od stanu niedoboru hormonów tarczycy, kiedy w mięśniu płaszczkowatym stwierdzono obniżone tempo glikolizy, po krótkotrwałym podawaniu T_3 stwierdzono wzrost tempa syntezy mleczanu (Dubaniewicz i wsp. 1989; Dimitriadis i wsp. 1997). Sugden i wsp. (2000) wykazali, że zwiększone beztlenowe utlenianie glukozy w krótkotrwałej hipertyreozie związane jest ze zwiększoną ekspresją izoformy 4 kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (PDK4). Autorzy ci sugerują, że zmniejszona synteza acetyloCoA z pirogronianu zwiększa wykorzystanie acetyloCoA pochodzącego z kwasów tłuszczowych. Zatem zwiększone utlenianie kwasu palmitynowego przez mięsień płaszczkowaty u zwierząt z nadmiarem hormonów tarczycy mogło być spowodowane zmniejszoną zdolnością mięśnia do utleniania glukozy w mitochondriach.

W latach 50-tych XX wieku sugerowano, że jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za wzrost tempa przemian metabolicznych pod wpływem T_3 jest rozprężenie transportu elektronów w łańcuchu oddechowym od syntezy ATP (Martius i Hess 1951). Ostatnio, po odkryciu całej rodziny białek rozprzegających (UCPs) w wielu innych tkankach niż brunatna tkanka tłuszczowa powrócono do tej koncepcji. Zaobserwowano bowiem, że pod wpływem T_3 wzrasta, a przy braku T_3 obniża się stężenie białek UCP2 i UCP3 w takich tkankach jak mięśnie szkieletowe i serce (Gong i wsp. 1997, Lanni i wsp. 1999, Jekabsons i wsp. 1999, Short i wsp. 2001, De Lange i wsp. 2001). Wprawdzie dotychczas nie wyjaśniono jaką rolę pełnią te białka, a zwłaszcza UCP3 w metabolizmie mięśni, lecz jest coraz więcej przesłanek, że może być ono zaangażowane w regulację tempa utleniania KT w mitochondriach. Wydaje się, że jedną z ról UCP3 może być przenoszenie anionów kwasów tłuszczowych z

mitochondrium do cytoplazmy, w sytuacji kiedy kwasy tłuszczowe są dominującym substratem w mitochondriach (Hims-Hagen i Harper 2001; Moore i wsp. 2001).

Zatem brak istotnie podwyższonego tempa utleniania KP przez mięsień płaszczkowaty u szczurów, którym podano T_3 przy wysokim stężeniu tego kwasu w mieszaninie inkubacyjnej mógłby wynikać ze zwiększonego stężenia białka UCP3 u tych zwierząt.

Zwiększone wbudowywanie KP w TG, PL i DG/MG u szczurów z nadmiarem trijodotyroniny wynikało prawdopodobnie ze zwiększonego wychwytu KP przez włókna mięśniowe. Poza tym podwyższone tempo tych procesów mogło być związane ze zwiększoną dostępnością glicerolo-3-fosforanu w komórce mięśniowej czy z podwyższoną aktywnością enzymów zaangażowanych w procesie syntezy glicerolipidów.

Należy podkreślić, że stan czynnościowy tarczycy nie miał wpływu na procentowy udział KP we frakcjach: TG, MD/DG i PL w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Zastosowany w pracy model *in vitro* okazał się właściwy do badań wychwytu kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe szczura, umożliwiając także prześledzenie ich losów w mięśniu płaszczkowatym.
 - Stosując metodę immunohistochemiczną sprawdzono, że kwas palmitynowy w kompleksie z albuminą dyfunduje z medium inkubacyjnego do wnętrza mięśnia.
 - Sprawdzono, że w zastosowanych warunkach preinkubacji/inkubacji zawartość wysokoenergetycznych fosforanów (ATP i CrP) oraz potencjał energetyczny mięśnia płaszczkowatego nie ulegają istotnym zmianom, co wskazuje na zachowanie żywotności mięśnia w tych warunkach.
 - Wykazano liniową zależność pomiędzy czasem trwania inkubacji a tempem wychwytu [¹⁴C]- kwasu palmitynowego z medium, jego utlenianiem do CO₂ oraz wbudowywaniem się w triacyloglicerole (TG), mono-/diacyloglicerole (MG/DG) oraz fosfolipidy (PL).
 - Zależność między całkowitym stężeniem KP w medium i tempem ocenianych procesów miała również przebieg liniowy.
 - Określony metodą chromatografii cienkowarstwowej procentowy udział KP w poszczególnych frakcjach lipidowych nie ulegał zmianie pomimo zróżnicowanego stężenia tego kwasu w medium (TG>PL>MG/DG).
 - Wyznaczenie objętości przestrzeni międzykomórkowej wskazuje, że większość oznaczanych kwasów tłuszczowych jest w niej zlokalizowana, toteż stężenie wewnątrzkomórkowych KT było niewykrywalne.
2. Stwierdzono, że tempo utleniania kwasu palmitynowego i jego wbudowywania w TG wzrasta wraz ze wzrostem [KP] i [nKP] w medium inkubacyjnym. Tempo badanych procesów wykazuje liniową zależność od całkowitego stężenia KP, natomiast gdy odniesie się te wyniki do stężenia niezwiązanego z albuminą KP (nKP) kinetyka tych procesów przybiera charakter wskazujący na wysycenie.
3. Przy zwiększaniu puli KP z równoczesnym utrzymywaniem na stałym poziomie puli nKP tempo wychwytu KP, jego utleniania do CO₂ i wbudowywania się w TG, MG/DG oraz PL wykazywało także liniową zależność od całkowitego stężenia KP w mieszaninie inkubacyjnej, jednak tempo przyrostu ocenianych procesów było znacznie wolniejsze.

4. U szczurów z doświadczalnie wywołanym niedoborem hormonów tarczycy stwierdzono wzrost tempa syntezy TG w mięśni płaszczkowatym z tendencją do spowolnienia tego procesu przy najwyższym stężeniu KP w medium, nie zaobserwowano natomiast zmian w tempie wychwytu i utleniania tego kwasu oraz jego wbudowywania w MG/DG i PL w porównaniu do wartości uzyskanych u szczurów w eutyreozie.
5. U szczurów z krótkotrwałe (3 dni) podwyższonym stężeniem T_3 we krwi stwierdzono zwiększone tempo wychwytu KP już przy najniższym stężeniu tego kwasu w medium czemu towarzyszyło podwyższone tempo wbudowywania KP we frakcje TG, MG/DG i PL oraz tendencja do wzrostu tempa utleniania KP do CO_2 .

Uzyskane wyniki sugerują, że u szczura metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśni płaszczkowatym *in vitro* zależy zarówno od puli kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą jak i od całkowitego stężenia kwasów tłuszczowych. Nawet krótkotrwałe podwyższenie stężenia T_3 we krwi powoduje przyśpieszenie tempa przemian metabolicznych KT w mięśniach oksydacyjnych (m. płaszczkowaty).

8. STRESZCZENIE

Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (KT) są ważnym substratem energetycznym dla mięśni szkieletowych, są również niezbędne do odbudowy puli wewnątrzmięśniowych triacylogliceroli (TG) i biosyntezy fosfolipidów (PL), które są istotnym składnikiem błon endoplazmatycznych. KT wykorzystywane przez włókna mięśniowe są dostarczane do mięśni przez przepływającą przez nie krew i pochodzą z rozpadu TG zmagazynowanych w tkance tłuszczowej, jak również z lipolizy TG osocza zawartych w chylomikronach i lipoproteinach o bardzo małej gęstości (VLDL). Ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność w roztworach wodnych, KT zarówno we krwi jak i w przestrzeni pozakomórkowej tkanek są transportowane w kompleksie z albuminą. Powinowactwo albuminy do KT jest bardzo duże co powoduje, że prawie wszystkie kwasy tłuszczowe są z nią związane, a tylko niewielka ich część (mniej niż 0,01% całkowitej puli) jest rozpuszczona w środowisku wodnym i stanowi pulę kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą (nKT). Wraz ze wzrostem stosunku całkowitego stężenia KT do stężenia albuminy podwyższa się pula nKT, przy czym zależność ta ma charakter funkcji eksponencjalnej (Richieri i wsp. 1993).

Wychwytywanie i wykorzystanie KT przez mięśnie szkieletowe zależą od wielu czynników między innymi od: rodzaju włókien mięśniowych, aktywności skurczowej mięśnia czy stężenia kwasów tłuszczowych we krwi, na które z kolei wpływa stan nasycenia organizmu (głód vs. nakarmienie), rodzaj stosowanej diety, tempo uwalniania KT z tkanki tłuszczowej czy nasilenia lipolizy TG osocza. Dostępność KT z krwi oraz ich wewnątrzmięśniowy metabolizm regulowany jest między innymi przez adrenalinę i insulinę, a pewną rolę odgrywać mogą także hormony tarczycy. O ile stosunkowo wiele jest danych na temat wpływu hormonów tarczycy na tempo utleniania i estryfikacji KT w takich tkankach jak: wątroba, tkanka tłuszczowa i serce, to wpływ stanu czynnościowego tarczycy na metabolizm lipidów w mięśniach szkieletowych oraz mechanizmy jego kontroli w tej tkance są dotychczas bardzo słabo poznane.

Wychwytywanie, utlenianie i wbudowywanie KT w lipidy wewnątrzmięśniowe przez mięśnie szkieletowe można badać *in vivo*, *in situ* i *in vitro*. W modelu *in vivo* podaje się w iniekcji dożylniej znakowany kwas tłuszczowy, a następnie na podstawie piętna izotopowego w wydychanym CO₂ i w poszczególnych frakcjach lipidowych wyekstrahowanych z mięśnia określa się tempo utleniania KT i syntezy lipidów. Metoda *in vivo* wymaga stosowania dużych dawek znakowanego kwasu tłuszczowego, ponieważ znaczna jego ilość jest wychwytywana przez wątrobę. Ponadto ze względu

na hydrolizę TG przez lipazę lipoproteinową w naczyniach kapilarnych włókien mięśniowych trudno jest określić stężenie KT dostępnych bezpośrednio dla miocytów. Z tego względu, w obecnej pracy do określenia wychwytu i metabolizmu KT w mięśniu szkieletowym szczura wybrano model *in vitro*, stosowany dotychczas w naszym Zakładzie w badaniach nad metabolizmem glukozy i wrażliwością na insulinę mięśni szkieletowych szczura.

Do badań wybrano mięsień płaszczkowy (m. soleus) z uwagi na to, że jest to mięsień płaski o niewielkiej masie, co pozwala na uniknięcie problemów z prawidłową dyfuzją tlenu do jego wnętrza. Poza tym mięsień ten składa się przede wszystkim z włókien oksydacyjnych (ok. 69%) oraz oksydacyjno-glikolitycznych (ok. 31%) i wychwytuje znacznie więcej KT niż inne niewielkie mięśnie szczura wykorzystywane w modelach *in vitro*.

W warunkach *in vivo* z uwagi na stałe stężenie albuminy we krwi, wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KT w osoczu wzrasta jednocześnie wielkość kompleksu KT-albumina oraz stężenie kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą (nKT). Ze względu na to, że nie ma jak dotąd pewności czy i w jakim stopniu frakcja nKT odgrywa rolę w wychwycie KT przez mięśnie szkieletowe postanowiono, wykorzystując model *in vitro* zbadać jak zmienia się wychwyt, utlenianie kwasu tłuszczowego oraz tempo jego wbudowywania się w TG i PL wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KT przy zachowaniu stałej puli nKT w medium inkubacyjnym.

Głównymi celami obecnej pracy było:

1. Sprawdzenie czy zastosowana metoda *in vitro* pozwala na prawidłową ocenę wychwytu kwasu tłuszczowego przez mięsień płaszczkowy szczura oraz prześledzenie losów tego kwasu w komórkach mięśniowych poprzez określenie tempa utleniania KT do CO₂ oraz wbudowywania się tego kwasu w pule acylogliceroli i fosfolipidów.
2. Określenie udziału frakcji kwasów tłuszczowych związanych i niezwiązanych z albuminą na wychwyt KT przez mięsień płaszczkowy, tempo jego utleniania do CO₂ oraz wbudowywania w lipidy wewnątrzmięśniowe.
3. Z uwagi na słabo poznaną rolę hormonów tarczycy w kontroli metabolizmu lipidów w mięśniach szkieletowych postanowiono także zbadać czy u szczurów z doświadczalnie wywołanym stanem niedoboru lub nadmiaru T₃ tempo wychwytu KT przez izolowany mięsień płaszczkowy oraz tempo jego metabolizmu w miocytach ulegają zmianom.

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar.

Do określenia wychwytu i metabolizmu kwasów tłuszczowych w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym użyto kwasu palmitynowego (KP), ponieważ jest to jeden z kwasów tłuszczowych powszechnie występujących we krwi szczura i jego zawartość w lipidach wewnątrzmięśniowych mięśnia płaszczkowatego jest także duża.

Wykonano 3 główne serie doświadczalne.

A. Celem pierwszej serii badań było dopracowanie metody umożliwiającej pomiar tempa wychwytu kwasu palmitynowego (KP) przez inkubowany mięsień płaszczkowaty oraz prześledzenie przemian (losów) tego kwasu wewnątrz mięśnia.

Oceniono żywotność inkubowanego mięśnia oznaczając w nim stężenie nukleotydów adenylowych: ATP, ADP, AMP oraz fosfokreatyny (CrP) przed rozpoczęciem i po 30 min inkubacji poprzedzonej 15 min preinkubacją.

Sprawdzono jakościową metodą immunohistochemiczną czy kwas palmitynowy w kompleksie z albuminą dyfunduje do wnętrza inkubowanego mięśnia.

Zbadano jak zmienia się wychwyty KP znakowanego węglem C^{14} przez mięsień płaszczkowaty wraz z czasem trwania inkubacji oraz określono tempo jego utleniania i wbudowywania się do puli lipidów wewnątrzmięśniowych.

Oceniono zależności pomiędzy całkowitym stężeniem kwasu palmitynowego w mieszaninie inkubacyjnej a tempem wychwytu i wykorzystania tego kwasu przez mięsień płaszczkowaty.

W celu określenia jaką część wyekstrahowanych KT stanowią KT wewnątrzmięśniowe, oznaczono wielkość przestrzeni pozakomórkowej mięśnia płaszczkowatego wykorzystując [3H]-inulinę.

B. W drugiej serii badań, stosując opracowany model doświadczalny, zbadano czy i w jakim stopniu tempo wychwytu KP i jego metabolizm w mięśniu płaszczkowatym zależą od puli tego kwasu niezwiązanego z albuminą (nKP). W tym celu mięśnie płaszczkowate pobrane od szczurów inkubowano w roztworach o wzrastającym całkowitym stężeniu KP przy jednocześnie wzrastającym, bądź stałym stężeniu puli nKP.

C. W trzeciej serii doświadczeń podjęto próbę oceny zależności tempa wychwytu i wykorzystania KT przez mięsień płaszczkowaty *in vitro* od stężenia hormonów tarczycy we krwi.

Badaniami tej serii objęto trzy grupy zwierząt:

1) szczury kontrolne, w stanie eutyreozy;

2) szczury z niedoborem hormonów tarczycy, wywołanym operacyjnym usunięciem tarczycy a następnie podawaniem w wodzie do picia 0,04% roztworu propyltiouracylu przez 5 tygodni;

3) szczury o podwyższonym poziomie trijodotyroniny we krwi (T_3) wywołanym podawaniem tego hormonu w dawce 75 $\mu\text{g } T_3/100 \text{ g m.c}$ przez 3 kolejne dni w iniekcjach dootrzewnowych.

W celu scharakteryzowania profilu lipidowego zwierząt wszystkich badanych grup oznaczano stężenie niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (KT) i triacylogliceroli (TG) w surowicy krwi oraz zawartość TG w mięśniu płaszczkowatym.

Mięsień płaszczkowaty izolowano wraz ze ścięgnami, dzielono go wzdłuż włókien na dwie części i podwiązywano za ścięgna do stalowych klamerek. Tak przygotowaną próbkę mięśnia poddawano 15 min preinkubacji w buforze Krebsa-Ringera zawierającym 1,5 % albuminę bydlęcą wolną od kwasów tłuszczowych oraz 5,5 mM glukozę. Następnie próbkę mięśnia przenoszono do świeżego buforu inkubacyjnego zawierającego dodatkowo palmitynian sodu o stężeniu 0,5; 1,0 lub 1,5 mM oraz śladowe ilości 1- $[C^{14}]$ -palmitynianu i inkubowano przez 20 minut.

Stosunek stężeń molarnych kwasu palmitynowego i albuminy ($v = [KP]/[Alb]$) w przygotowywanych roztworach wzrastał wraz ze wzrostem stężenia KP. W doświadczeniach mających na celu zbadanie udziału puli kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą na wychwyt i wykorzystanie tego kwasu przez mięsień skrawki mięśnia inkubowano w roztworach o wzrastającym stężeniu zarówno KP (0,5 ; 1,0 ; 1,5 mM) jak i albuminy (0,147 ; 0,294 ; 0,442 mM) tak aby zachować stałą wartość v .

Po zakończeniu inkubacji, w celu uwolnienia wytworzonego podczas inkubacji CO_2 do roztworu inkubacyjnego dodawano kwas nadchlorowy.

Lipidy z inkubowanego mięśnia płaszczkowatego ekstrahowano mieszaniną Folcha (chloroform : metanol, 2 :1 v/v). Uzyskany ekstrakt lipidowy rozdzielano na frakcje: triacylogliceroli (TG), monoacylogliceroli (MG) diacylogliceroli (DG), fosfolipidów (PL) i kwasów tłuszczowych (KT) stosując chromatografię cienkowarstwową, a następnie mierzono radioaktywność każdej frakcji.

Podsumowanie wyników i wnioski

1. Stwierdzono, że zastosowany w pracy model *in vitro* jest właściwy do badań wychwytu kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe szczura, umożliwiając także prześledzenie ich losów w mięśniu.

- Stosując metodę immunohistochemiczną sprawdzono, że kwas palmitynowy w kompleksie z albuminą dyfunduje z medium inkubacyjnego do wnętrza mięśnia.
- Sprawdzono, że w zastosowanych warunkach preinkubacji/inkubacji zawartość wysokoenergetycznych fosforanów (ATP i CrP) oraz potencjał energetyczny mięśnia płaszczkowatego nie ulegają istotnym zmianom, co wskazuje na zachowanie żywotności mięśnia w tych warunkach.
- Wykazano liniową zależność pomiędzy czasem trwania inkubacji a tempem wychwytu [¹⁴C]- kwasu palmitynowego z medium, jego utlenianiem do CO₂ oraz wbudowywaniem się w triacyloglicerole (TG), mono-/diacyloglicerole (MG/DG) oraz fosfolipidy (PL).
- Zależność między całkowitym stężeniem KP w medium i tempem ocenianych procesów miała również przebieg liniowy.
- Wykazano, że określony metodą chromatografii cienkowarstwowej procentowy udział KP w poszczególnych frakcjach lipidowych nie ulegał zmianie pomimo zróżnicowanego stężenia tego kwasu w medium (TG>PL>MG/DG).
- Wyznaczenie objętości przestrzeni międzykomórkowej wskazuje, że większość oznaczanych kwasów tłuszczowych jest w niej zlokalizowana, toteż stężenie wewnątrzkomórkowych KT było niewykrywalne.

2. Stwierdzono, że tempo utleniania kwasu palmitynowego i jego wbudowywania w TG wzrasta wraz ze wzrostem [KP] i [nKP] w medium inkubacyjnym. Tempo badanych procesów wykazuje liniową zależność od całkowitego stężenia KP, natomiast gdy odniesie się te wyniki do stężenia niezwiązanego z albuminą KP (nKP) kinetyka tych procesów przybiera charakter wskazujący na wysycenie.

3. Przy zwiększaniu puli KP z równoczesnym utrzymywaniem na stałym poziomie puli nKP tempo wychwytu KP, jego utleniania do CO₂ i wbudowywania się w TG, MG/DG oraz PL wykazywało także liniową zależność od całkowitego stężenia KP w mieszaninie inkubacyjnej, jednak tempo przyrostu ocenianych procesów było znacznie wolniejsze.

4. U szczurów z doświadczalnie wywołanym niedoborem hormonów tarczycy stwierdzono wzrost tempa syntezy TG w mięśniu płaszczkowatym z tendencją do spowolnienia tego procesu przy najwyższym stężeniu KP w medium, nie zaobserwowano natomiast zmian w tempie wychwytu i utleniania tego kwasu oraz jego wbudowywania w MG/DG i PL w porównaniu do wartości uzyskanych u szczurów w eutyreozie.

5. U szczurów z krótkotrwałe (3 dni) podwyższonym stężeniem T_3 we krwi wykazano zwiększone tempo wychwytu KP już przy najniższym stężeniu tego kwasu w medium czemu towarzyszyło podwyższone tempo wbudowywania KP we frakcje TG, MG/DG i PL oraz tendencja do wzrostu tempa utleniania KP do CO_2 .

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują, że u szczura metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśni płaszczkowatym *in vitro* zależy zarówno od puli kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą jak i od całkowitego stężenia kwasów tłuszczowych. Nawet krótkotrwałe podwyższenie stężenia T_3 we krwi powoduje przyspieszenie tempa przemian metabolicznych KP w mięśniach oksydacyjnych (m. płaszczkowaty).

9. PIŚMIENICTWO

1. **Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. 2000.** The subcellular localization of acyl-CoA carboxylase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1444-1449.
2. **Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KAH, Wakil SJ. 2001.** Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2 *Science* 291: 2613-2616.
3. **Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A. 1999.** Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP, FABPpm. *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 4-13.
4. **Abumrad N, Harmon C, Ibrahimi A. 1998.** Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J. Lipid Res.* 39: 2309-2318.
5. **Alam S. and Saggerson DE. 1998.** Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *Biochem. J.* 334: 233-241.
6. **Antohe F, Dobrila L, Heltianu C, Simionescu N, Simionescu M. 1993.** Albumin-binding proteins function in the receptor-mediated binding and transcytosis of albumin across cultured endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 60: 268-275.
7. **Armstrong RB. and Phelps RO. 1995.** Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* 171: 259-272.
8. **Atkinson DE. 1968.** The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4034.
9. **Baht HS. and Saggerson ED. 1988.** Comparison of triacylglycerol synthesis in rat brown and white adipocytes. Effects of hypothyroidism and streptozotocin-diabetes on enzyme activities and metabolic fluxes. *Biochem. J.* 250: 325-333.
10. **Baldwin KM, Hooker AM, Herrick RE, Schreder LF. 1980.** Respiratory capacity and glycogen depletion in thyroid-deficient muscle. *J Appl Physiol* 49: 102-106.
11. **Berk PD. and Strump DD. 1999.** Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.* 192: 17-31.
12. **Bergo M, Olivecrona G, Olivecrona T. 1996.** Forms of lipoprotein lipase in rat tissues: in adipose tissue the proportion of inactive lipase increases on fasting. *Biochem. J.* 313: 893-898.
13. **Bilezikian JP, Loeb JN. 1983.** The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. *Endocr Rev* 4: 378-388.

14. **Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ. 1999.** Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J.* 13: 805-812.
15. **Boggs KP. and Buse MG. 1995.** Effect of insulin on SN-1,2-diacylglycerol species and de novo synthesis in rat skeletal muscle. *Metabolism: Clin.Exp.* 44: 348-357.
16. **Bonen A, Luiken JJFP, Arumugam Y, Glatz JFC, Tandon NN. 2000.** Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.* 275: 14501-14508.
17. **Bonen A, Dyck DJ, Ibrahimi A, and Abumrad N. 1999.** Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am. J. Physiol.* 276: E642 -E649.
18. **Bonen A, Dyck DJ, Luiken JFP. 1998a.** Skeletal muscle fatty acid transport and transporters. W: Skeletal muscle metabolism in exercise and diabetes. Wyd. Plenum Press, New York, str: 193-205.
19. **Bonen A, Luiken JJFP, Liu S, Dyck DJ, Kiens B, Kristiansen S, Turcotte LP, Van der Vusse GJ, and Glatz JFC. 1998b.** Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *Am. J. Physiol.* 275: E471 - E478.
20. **Bonen A, Clark MG, Henriksen EJ. 1994.** Experimental approaches in muscle metabolism: hindlimb perfusion and isolated muscle incubations. *Am. J. Physiol.* 266: E1-E16.
21. **Borgstrom B. and Olivecrona T. 1961.** The metabolism of palmitic acid-1-C14 in functionally hepatectomized rats. *J. Lipid Res.* 2: 263-267.
22. **Budohoski L, Gorski J, Nazar K, Kaciuba-Uścilko, Terjung RL. 1996.** Triacylglycerol synthesis in the different skeletal muscle fiber sections of the rat. *Am. J. Physiol.* 271: E574-E581.
23. **Budohoski L, Panczenko-Kresowska B, Langfort J, Żernicka E, Dubaniewicz A, Ziemiański S, Challiss RA, Newsholme EA. 1993.** Effect of saturated and polyunsaturated fat enriched diet on the skeletal muscle insulin sensitivity in young rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 44: 391-398.
24. **Budohoski L, Challiss RA, Dubaniewicz A, Kaciuba-Uścilko H, Leighton B, Lozeman FJ, Nazar K, Newsholme EA, Porta S. 1987.** Effects of prolonged elevation of plasma adrenaline concentration in vivo on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *Biochem. J.* 244: 655-660.
25. **Budohoski L, Challiss RA, McManus B, Newsholme EA. 1984.** Effects of

analogues of adenosine and methyl xanthines on insulin sensitivity in soleus muscle of rat. *FEBS Lett.* 167: 1-4.

26. **Burczynski FJ, Cai ZS. 1994.** Palmitate uptake by hepatocyte suspensions: effect of albumin. *Am. J. Physiol.* 267: G371-G379.
27. **Capo LA, Sillau AH. 1983.** The effect of hyperthyroidism on capilarity and oxidative capacity in rat soleus and gastrocnemius muscles. *J. Physiol.* 342: 1-14.
28. **Castellani LW, Wilcox HC, Heimberg M. 1991.** Relationship between fatty acid synthesis and lipid secretion in the isolated perfused rat liver: effect of hyperthyroidism, glucose, and oleate. *Biochim.Biophys. Acta* 1086: 197-208.
29. **Challiss RAJ, Espinal J, Newsholme EA. 1983.** Insulin sensitivity of rates of glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. *Biosci. Rep.* 3: 675-679.
30. **Chen KS, Heydrick SJ, Brown ML, Friel JC, Ruderman NB. 1994.** Insulin increases a biochemically distinct pool of diacylglycerol in the rat soleus muscle. *Am. J. Physiol.* 266: E479-E485.
31. **Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP, Ruderman NB. 2000.** Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am. J. Physiol.* 279: E259-E265.
32. **Christiansen R, Borrebaek B, BromerJ. 1976.** The effect of (-)carnitine on the metabolism of palmitate in liver cells isolated from fasted and refed rat. *FEBS Lett.*62: 313-317.
33. **Cieslar J, Hunang MT, Dobson GP. 1998.** Tissue space in rat heart, liver, and skeletal muscle in vivo. *Am. J. Physiol.* 275: R1530-R1536.
34. **Clark MG, Rattigan S, Clerk LH, Vincent MA, Clark ADH, Youd JM, Newman JMB. 2000.** Nutritive and non-nutritive blood flow: rest and exercise. *Acta Physiol. Scand.* 168: 519-530.
35. **Clerk LH, Smith ME, Rattigan S, Clark MG. 2000.** Increased chylomicron triglyceride hydrolysis by connective tissue flow in perfused rat hindlimb: implications for lipid storage. *J. Lipid Res.* 41: 329-335.
36. **Coburn CT, Knapp FF, Jr., Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA. 2000.** Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275: 32523-32529.
37. **Coe NR, Smith AJ, Frohnert BI, Watkins PA, Bernlohr DA. 1999.** The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 274:

36300-36304.

38. **Coleman RA, Lewin TM, Muoio DM. 2000.** Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 20: 77-103.
39. **Courtright JB. and Fitts RH. 1979.** Effects of thyrotoxicosis on mitochondrial enzymes of rat soleus. *Horm. Metab. Res.* 11: 304-6.
40. **Courtright RN, Muoio DM, Dohm GL. 1997.** Skeletal muscle lipid metabolism: A frontier for new insights into homeostasis. *Nutritional Biochemistry* 8: 228-245.
41. **Crettaz M, Prentki M, Zaninetti D, Jeanrenaud B. 1980.** Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites. *Biochem. J.* 86: 525-534.
42. **Dang AQ, Faas FH, Carter WJ. 1985.** Influence of hypo- and hyperthyroidism on rat liver glycerophospholipid metabolism. *Lipids* 20: 897-902.
43. **Dapson RW. 1993.** Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotechnic. Histochem.* 68: 75-82.
44. **DeGrella RF. and Light RJ. 1980 a.** Uptake and metabolism of fatty acids by dispersed adult rat heart myocytes. I. Kinetics of homologous fatty acids. *J. Biol. Chem.* 255: 9731-9738.
45. **DeGrella RF. and Light RJ. 1980 b.** Uptake and metabolism of fatty acids by dispersed adult rat heart myocytes. II. Inhibition by albumin and fatty acid homologues, and the effect of temperature and metabolic reagents. *J. Biol. Chem.* 255: 9739-9745.
46. **De Lange P, Lanni A, Beneduce L, Moreno M, Lombardi A, Silvestri E, Goglia F. 2001.** Uncoupling protein-3 is molecular determinant for regulation of resting metabolic rate by thyroid hormone. *Endocrinology* 142: 3414-3420.
47. **De Luise M, Harker M. 1989.** Skeletal muscle metabolism: effect of age, obesity, thyroid and nutritional status. *Horm. Metab. Res.* 21: 410-415.
48. **Dimitriadis G, Parry-Billings M, Bevan S, Leighton B, Krause U, Piva T, Tegos K, Challiss RA, Wegener G, Newsholme EA. 1997.** The effects of insulin on transport and metabolism of glucose in skeletal muscle from hyperthyroid and hypothyroid rats. *Eur. J. Clin. Invest.* 27: 475-483.
49. **Dircks LK. and Sul HS. 1997.** Mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1348: 17-26.
50. **Donsmark M, Langfort J, Ploug T, Galbo H. 2002.** Protein kinase C is involved in the concentration-mediated activation of hormone-sensitive lipase (HSL) in rat skeletal

muscle. *J. Physiol. Proc.* 539.P: 98

51. **Dory L. and Roheim PS. 1981.** Rat plasma lipoproteins and apolipoproteins in experimental hypothyroidism. *J. Lipid Res.* 22: 287-296.
52. **Dubaniewicz A, Kaciuba-Uściłko H, Nazar K, Budohoski L. 1989.** Sensitivity of the soleus muscle to insulin in resting and exercising rats with experimental hypo- and hyper-thyroidism. *Biochem. J.* 263: 243-247.
53. **Dyck DJ, Steinberg G, Bonen A. 2001.** Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle. *Am. J. Physiol* 281: E600-E607.
54. **Dyck DJ, Miskovic D, Code L, Luiken JJ, Bonen A. 2000.** Endurance training increases FFA oxidation and reduces triacylglycerol utilization in contracting rat soleus. *Am. J. Physiol.* 278: E778-E785.
55. **Dyck DJ. and Bonen A. 1998.** Muscle contraction increases palmitate esterification and oxidation and triacylglycerol oxidation. *Am. J. Physiol.* 275: E888 - E896.
56. **Dyck DJ, Peters SJ, Glatz J, Gorski J, Keizer H, Kiens B, Liu S, Richter EA, Spriet LL, van der Vusse GJ, Bonen A. 1997.** Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various fiber types. *Am. J. Physiol.* 272: E340-E351.
57. **Eaton P. and Steinberg D. 1961.** Effects of medium fatty acid concentration, epinephrine, and glucose on palmitate-1-C¹⁴ oxidation and incorporation into neutral lipids by skeletal muscle in vitro. *J. Lipid Res.* 2: 376-382.
58. **Eggstein M. and Kuhlmann 1973.** A method for the enzymatic determination of glycerol. W: Method of enzymatic analysis. Wyd. Bergmeyer HU. Acad. Press, NY, London, str: 1825-1831.
59. **Enevolden LH, Stallknecht B, Langfort J, Petersen LN, Holm C, Ploug T, Galbo H. 2001.** The effect of exercise training on hormone-sensitive lipase in rat intra-abdominal adipose tissue and muscle. *J. Physiol.* 536: 871-877.
60. **Elsing C, Górski J, Boeker C, Stremmel W. 1998.** Long-chain fatty acid uptake by skeletal myocytes: a confocal laser scanning microscopy study. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 744-750.
61. **Evans K, Clark ML, Frayn KN. 1999.** Effects of an oral and intravenous fat load and adipose tissue and forearm lipid metabolism. *Am. J. Physiol.* 276: E241-E248.
62. **Faergeman NJ, and Knudsen J. 1997.** Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem. J.* 323: 1-12.

63. **Farese RV Jr, Cases S, Smith SJ. 2000.** Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerol acyltransferase. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 229-234.
64. **Fitts RH, Winder WW, Brooke MH, Kaiser KK. 1980.** Contractile, biochemical and histochemical properties of thyrotoxic rat soleus muscle. *Am. J. Physiol.* 238: C15-C20.
65. **Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GM. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
66. **Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphreys SM. 1995.** Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Advan. Enzyme Regul.* 35: 163-178.
67. **Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. 1999.** Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J. Biol. Chem.* 274: 3970-3977.
68. **Gazdag AC, Tucker MZ, Turcotte LP, Dean DJ, Cartee GD. 1998.** Effect of extracellular palmitate on 2-deoxy-d-glucose uptake in muscle from Ad libitum fed and calorie restricted rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252: 733-777.
69. **Glatz JFC. and Van der Vusse GJ. 1996.** Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance. *Prog. Lipid Res.* 35: 243-282.
70. **Glatz JFC. and Veerkamp JH. 1982.** Palmitate oxidation by intact preparations of skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 713: 230-239.
71. **Gong DW, He Y, Karas M, Reitman M. 1997.** Uncoupling protein-3 is a mediator of thermogenesis regulated by thyroid hormone, β 3-adrenergic agonists, and leptin. *J. Biol. Chem.* 272: 24129-24132.
72. **Goodpaster BH. and Kelley DE. 1998.** Role of muscle in triglyceride metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 9: 231-236.
73. **Gorski J. 1992.** Muscle triglyceride metabolism during exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: 123-131.
74. **Gorski J. and Bonen A. 1997.** Palmitate incorporation into lipids pools of contracting red and white muscles. *Mol. Cell. Biochem.* 166: 73-83.
75. **Górecka M, Synak M, Budohoski L, Langfort J, Moskalewski S, Żernicka E.** Palmitic acid uptake by the rat soleus muscle in vitro. *Biochem. Cell Biol.* 419-424.
76. **Górecka M, Dubaniewicz A, Żernicka E, Budohoski L. 1999.** Effect of fatty acid availability on glucose utilization in the rat soleus muscle in vitro. *J. Physiol.*

Pharmacol. 50, Suppl. 1: 85.

77. **Górski J, Nawrocki A, Murthy M. 1998.** Characterization of free and glyceride-esterified long chain fatty acids in different skeletal muscle types of the rat. *Mol. Cell. Biochem.* 178: 113-118.
78. **Graham RC. and Karnovsky MJ. 1966.** The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 291-302.
79. **Greenwalt DE, Scheck SH, Rhinehart-Jones T. 1995.** Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *J. Clin. Invest.* 96: 1382-1388.
80. **Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP. 1994.** The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11012-11016.
81. **Guo Z. and Jensen MD. 1999.** Blood glycerol is an important precursor for intramuscular triacylglycerol synthesis. *J. Biol. Chem.* 274: 23702-23706.
82. **Habinowski S.A., Hirshman M, Sakamoto K, Kemp BE, Gould SJ, Goodyer LJ, Witters LA. 2001.** Malonyl-CoA decarboxylase is not a substrate of AMP-activated protein kinase in rat fast-twitch skeletal muscle or an islet cell line. *Archiv. Biochem. Biophys.* 396: 71-79.
83. **Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF, Zechner R. 2002.** Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* 277: 4806-4815.
84. **Hagstrom-Toft E, Enoksson S, Moberg E, Bolinder J and Arner P. 1998.** β -Adrenergic regulation of lipolysis and blood flow in human skeletal muscle in vivo. *Am. J. Physiol.* 275: E909 - E916.
85. **Hamilton J.A. 1998.** Fatty acid transport: difficult or easy? *J. Lipid Res.* 39: 467-481.
86. **Hamilton MT, Etienne J, McClure WC, Pavey BS, Holloway AK. 1998.** Role local contractile activity and muscle fiber type on LPL regulation during exercise. *Am. J. Physiol.* 275: E1016-E1022.
87. **Hardie DG. and Carling D. 1997.** The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* 246: 259-273.
88. **Harris RC, Hultman E, Nordesj LO. 1974.** Glycogen, glycolytic intermediates and high-energy phosphates determined in biopsy samples of musculus quadriceps femoris

- of man at rest. Methods and variance of values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 33: 109-120.
89. **Heathers GP, Al-Muthaseb N, Brunt RV. 1985.** The effect of adrenergic agents on the activities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and triglyceride lipase in the isolated perfused rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17: 785-796.
 90. **Heimberg M, Oludadewo JO, Wilcox HG. 1985.** Plasma lipoproteins and regulation of hepatic metabolism of fatty acids in altered thyroid states. *Endocrine Rev.* 6: 590-607.
 91. **Himms-Hagen J. and Harper ME. 2001.** Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 226: 78-84.
 92. **Hoch FL. 1988.** Lipids and thyroid hormones. *Prog. Lipid Res.* 27: 199-270.
 93. **Holm C, Belfrage P, Fedrikson G. 1987.** Immunological evidence for the presence of hormone-sensitive lipase in rat tissues other than adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148: 99-105.
 94. **Holness MJ, Kraus A, Harris RA, Sugden MC. 2000.** Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlines the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes* 49: 775-781.
 95. **Hopp JF. and Palmer WK. 1990.** Electrical stimulation alters fatty acid metabolism in isolated skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 68: 2473-2481.
 96. **Hulsmann WC, Stam H, Maccari F. 1982.** The effect of excess (acyl)-carnitine on lipid metabolism in rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 713: 39-45.
 97. **Hurley BF, Nemeth PM, Martin III WH, Hagburg JM, Dalsky GP, Holloszy JO. 1986.** Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J. Appl. Physiol.* 60: 562 - 567.
 98. **Hutber CA, Hardie DG, Winder WW. 1997.** Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase. *Am. J. Physiol.* 272: E262-E266.
 99. **Hutter JF, Piper HM, Spieckermann PG. 1984.** Myocardial fatty acid oxidation: evidence for an albumin-receptor-mediated membrane transfer of fatty acids. *Basic Res. Cardiol.* 79: 274-282.
 100. **Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. 1996.** Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid

transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2646-2651.

101. **Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R, Abumrad NA. 1999.** Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J. Biol. Chem.* 264: 26761-26766.
102. **Igal RA, Caviglia JM, De Gomez Dumm INT, Coleman RA. 2001a.** Diacylglycerol generated in CHO cell plasma membrane by phospholipase C is used for triacylglycerol synthesis. *J. Lipid. Res.* 42: 88-95.
103. **Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baro M, Coleman RA. 2001b.** Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 276: 42205-42212.
104. **Jakubiec-Puka A, Ciechowska I, Mackiewicz U, Langfort J, Chomontowska H. 1999.** Effect of thyroid hormone on myosin chain isoforms in slow and fast muscles of the rat. *Acta Biochim. Pol.* 46: 823-835.
105. **Jekabsons MB, Gregoire FM, Schonfeld-Warden NA, Warden CH, Horwitz BA. 1999.** T(3) stimulates resting metabolism and UCP-2 and UCP-3 mRNA but not nonphosphorylating mitochondrial respiration in mice. *Am. J. Physiol.* 277: E380-E389.
106. **Jansen MS, Cook GA, Song S, Park E. 2000.** Thyroid hormone regulates carnitine palmitoyltransferase 1 α gene expression through elements in the promoter and first intron. *J. Biol. Chem.* 275: 34989-34997.
107. **Kaciuba-Uściłko H, Dudley GA, Terjung RL. 1980.** Influence of thyroid status on skeletal muscle LPL activity and TG uptake. *Am. J. Physiol.* 238: E518-E523.
108. **Kaciuba-Uściłko H, Dudley GA, Terjung RL. 1981.** Muscle LPL activity, plasma and muscle triglycerides in trained thyroidectomized rats. *Horm. Metab. Res.* 13: 688-689.
109. **Kandarian SC, Boushel RC, Schulte LM. 1991.** Elevated interstitial fluid volume in rat soleus muscles by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.* 71: 910-914.
110. **Kaushik VK, Young ME, Dean DJ, Kurowski TG, Saha AK, Ruderman NB. 2001.** Regulation fatty acid oxidation and glucose metabolism in rat soleus muscle: effect of AICAR. *Am. J. Physiol.* 281: E335-E340.
111. **Kerner J. and Hoppel C. 2000.** Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 1-17.
112. **Keyes WG, Wilcox HG, Heimberg M. 1981.** Formation of the very low density

lipoprotein and metabolism of and 2 over black square]; [1 and 2 over black square]-¹⁴C]-oleate by perfused livers from rats treated with triiodothyronine or propylthiouracil. *Metabolism: Clin. Exp.* 30:135-146.

113. **Kiens B, Essen-Gustavsson B, Christensen NJ, Saltin B. 1993.** Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J. Physiol.* 469: 459-478.
114. **Kiens B, Essen-Gustavsson B, Gad P, Lithell H. 1987.** Lipoprotein lipase activity and intramuscular triglycerides stores after long-term high-fat and high-carbohydrate diets in physically trained men. *Clin. Physiol.* 7: 1-9.
115. **Kiens B, Roemen THM, Van der Vusse GJ. 1999.** Muscular long-chain fatty acid content during graded exercise in humans. *Am. J. Physiol.* 276: E352-E357.
116. **Kim JY, Koves TR, Yu GS, Gulick T, Cortright RN, Dohm GL, Muoio DM. 2002.** Evidence of a malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase I activity in red skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 282: E1014-E1022.
117. **Knudsen J, Jensen MV, Hansen JK, Faergeman NJ, Neergaard TBF, Gaigg B. 1999.** Role of acylCoA binding protein in acylCoA transport and cell signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 192: 95-103.
118. **Kubista V, Kubistova J, Pette D. 1971.** Thyroid hormone induced changes in the enzyme activity pattern of energy-supplying metabolism of fast (white), slow (red), and heart muscle of the rat. *Eur. J. Biochem.* 18: 553-560.
119. **Kvilekval K, Lin J, Cheng W, Abumrad N. 1994.** Fatty acids as determinants of triglyceride and cholesteryl ester synthesis by isolated hepatocytes: kinetics as a function of various fatty acids. *J. Lipid Res.* 35: 1786-1794.
120. **Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK. 1991a.** Regulation of lipoprotein lipase in muscle and adipose tissue during exercise. *J. Appl. Physiol.* 71: 404-409.
121. **Ladu MJ, Kapsas H, Palmer WK. 1991b.** Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissues during fasting. *Am. J. Physiol.* 260: R953-R959.
122. **Langfort J, Budohoski L, Dubaniewicz A, Challiss RA, Newsholme EA. 1993.** Exercise-induced improvement in the sensitivity of the rat soleus muscle to insulin is reversed by chloroadenosine- the adenosine receptor agonist. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 50: 18-23.
123. **Langfort J, Budohoski L, Kaciuba-Uściłko H, Nazar K, Challiss RA, Newsholme EA. 1991.** Effect of endurance and sprint exercise on the sensitivity of glucose metabolism to insulin in the epitrochlearis muscle of sedentary and trained rats. *Eur. J.*

Appl. Physiol. Occup. Physiol. 62: 145-150.

124. **Langfort J, Ploug T, Ihelemann J, Saldo M, Holm C and Galbo H. 1999.** Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle. *Biochem. J.* 340: 459 - 465.
125. **Langfort J, Ploug T, Ihelemann J, Holm C and Galbo H. 2000.** Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle. *Biochem. J.* 351: 207-214.
126. **Lanni A, Beneduce L, Lombardi A, Moreno M, Boss O, Muzzin P, Giacobino JP, Goglia F. 1999.** Expression of uncoupling protein-3 nad mitochondrial activity in the transition from hypothyroid tp hyperthyroid state in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 444: 250-254.
127. **Leighton B, Budohoski L, Lozeman FJ, Challiss RA, Newscholme EA. 1985.** The effect of prostaglandins E1, E2 and F2 alfa and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in stripped soleus muscles of the rat. *Biochem.. J.* 227: 337-340.
128. **Levak-Frank S, Radner H, Walsh A, Stollberger R, Knipping G, Hoefler G, Sattler W, Weinstock PH, Breslow JL, Zechner R. 1995.** Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 96: 976-86.
129. **Linder C. 1976.** Lipoprotein lipase and uptake of chylomicron triglyceride by skeletal muscle of the rats. *Am. J. Physiol.* 231: 860-864.
130. **Lomax RB, Robertson WR. 1992.** The effects of hypo- and hyperthyroidism on fibre composition and mitochondrial enzyme activites in rat skeletal muscle. *J. Endocrinol.* 133: 376-380.
131. **Luiken JJFP, Arumugam Y, Dyck DJ, Han X, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JFC, Bonen A. 2002.** Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am. J. Physiol.* 282: E491-E495.
132. **Luiken JJFP, Arumugam Y, Dyck DJ, Bell RC, Pelsers MML, Turcotte LP, Tandon NN, Glatz JFC. 2001a.** Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. *J. Biol. Chem.* 276: 40567-40573.
133. **Luiken JJFP, Willems J, Van der Vusse GJ, Glatz JF. 2001b.** Electrostimulation enhances FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake by isolated rat cardiac

myocytes. *Am. J. Physiol.* 281: E704-E712.

134. **Luiken JJFP, Schaap FG, Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JFC. 1999a.** Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids* 34: S169 - S175.
135. **Luiken JJFP, Turcotte LP, Bonen A. 1999b.** Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *J. Lipid Res.* 40: 1007-1016.
136. **Mangold HK. 1969.** W: Thin layer chromatography. Wyd. E. Stahl. Springer, N.Y. str: 363-421.
137. **Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. 1997.** Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acylCoA synthetase genes by PPAR alpha and PPAR gamma activators. *J. Biol. Chem.* 272: 28210-28217.
138. **Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D. 1998.** Control of human muscle-type carnitine palmitoyl-transferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 8560-8563.
139. **McAllister RM, Sansone JR JC, Laughlin MH. 1995.** Effects of hyperthyroidism on muscle blood flow during exercise in rat. *Am. J. Physiol.* 268: H330-H335.
140. **McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F. 1999.** Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J. Lipid Res.* 40: 1371-1383.
141. **McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. 1983.** Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. *Biochem. J.* 214: 21-28.
142. **Merrill GF, Kurth EJ, Rasmussen BB, Winder WW. 1998.** Influence of malonylCoA and palmitate concentration on rate of palmitate oxidation in rat muscle. *J. Appl. Physiol.* 85: 1909-1914.
143. **Moor GBT, Himms-Hagen J, Harper ME, Clapham JC. 2001.** Overexpression of UCP-3 in skeletal muscle of mice results in increased expression of mitochondrial thioesterase mRNA. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 283: 785-790.
144. **Moreno M, Lanni A, Lombardi A, Goglia F. 1997.** How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J. Physiol.* 505.2: 529-538.
145. **Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT Jr., Tapscott EB, Coleman RA, Dohn GL. 1997.** Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46: 1360-

- 1363.
146. **Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA. 1999a.** AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem. J.* 338: 783-791.
 147. **Muoio DM, Dohm GL, Tapscott EB, Coleman RA. 1999b.** Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice. *Am. J. Physiol.* 276: E913-E921.
 148. **Muoio DM, Lewin TM, Wiedmer P, Coleman RA. 2000.** Acyl-CoA are functionally channeled in liver: potential role of acyl-CoA synthetase. *Am. J. Physiol.* 279: E1366-E1373.
 149. **Okano G. and Shimojo T. 1982.** Utilization of long-chain free fatty acids in white and red muscle of rats. *Biochim. Biophys. Acta* 710: 122-127.
 150. **Olivecrona T, Bergh M, Hultin M, Peterson J, Patsch J, Vilaro S. 1997.** Lipoprotein lipase: regulation and role in lipoprotein metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 56: 723-729.
 151. **Ong JM, Simsolo RB, Saghizadeh M, Pauer A, Kern PA. 1994.** Expression of lipoprotein lipase in rat muscle: regulation by feeding and hypothyroidism. *J. Lipid Res.* 35: 1542-1551.
 152. **Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thomson MP. 1991.** Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J. Clin. Invest.* 87: 125-132.
 153. **Oscari LB, Essig DA, Palmer WK. 1990.** Lipase regulation of muscle triglyceride hydrolysis. *J. Appl. Physiol.* 69: 1571-1577.
 154. **Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. 1996.** Stimulation of carnitine translocase activity in heart mitochondria from hyperthyroid rats. *FEBS Lett.* 397: 260-262.
 155. **Paradies G, Ruggiero FM, Petrosillo G, Quagliariello E. 1997a.** Alterations in carnitine-acylcarnitine translocase activity and in phospholipid composition in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1362: 193-200.
 156. **Paradies G, Petrosillo G, Ruggiero FM. 1997b.** Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1319: 5-8.
 157. **Pease RJ, Wiggins D, Saggerson ED, Tree J, Gibbons GF. 1999.** Metabolic

- characteristics of a human hepatoma cell line stably transfected with hormone-sensitive lipase. *Biochem. J.* 341: 453-460.
- 158. Peters SJ, Dyck DJ, Bonen A, Spriet LL. 1998.** Effects of epinephrine on lipid metabolism in resting skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 275: E300 - E309.
- 159. Peters SJ, Harris RA, Heigenhauser GJF, Spriet LL. 2001.** Muscle fiber type comparison of PDH kinase activity and isoform expression in fed and fasted rats. *Am. J. Physiol.* 280: R661-R668.
- 160. Popovic L, Oreskovic K, Zupancic B, Petrunic M, Kunec-Vajic E. 1998.** The relation between plasma lipid levels and pseudocholinesterase activity in hypothyroidism. *Horm. Metab. Res.* 30: 137-140.
- 161. Randle PJ, Newsholme EA, Garland PB. 1964.** Regulation of glucose uptake by muscle 8: Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate and alloxan diabetes and stravation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J.* 93: 652-665.
- 162. Rauch B, Bode C, Piper HM, Hutter JF, Zimmermann R, Braunwell E, Hasselbach W, Kubler W. 1987.** Palmitate uptake in calcium tolerant, adult rat myocardial single cells-evidence for albumin mediated transport across sarcolemma. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 19: 159-166.
- 163. Richieri GV, Anel A, Kleinfeld AM. 1993.** Interactions of long-chain fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32: 7574-7580.
- 164. Richieri GV. and Kleinfeld AM. 1995.** Unbound free fatty acid levels in human serum. *J. Lipid Res.* 36: 229-240.
- 165. Roncari DAK, Murthy VK. 1975.** Effects of thyroid hormones on enzymes involved in fatty acid and glycerolipid synthesis. *J Biol Chem.* 250: 4134-4138.
- 166. Romeis B. 1948.** Mikroskopische Technik. Leibniz Verlag.
- 167. Rose H, Hennecke T, Kammermeier H. 1990.** Sarcolemmal fatty acid transfer in isolated cardiomyocytes governed by albumin/membrane-lipid partition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22: 883-892.
- 168. Rosenthal MD. 1981.** Accumulation of neutral lipids by human skin fibroblasts: differential effects of saturated and unsaturated fatty acids. *Lipids* 16: 173-182.
- 169. Rubin BB, Chang G, Liauw S, Young Rymaschin A, Walker PP. 1992.** Phospholipid peroxidation deacylation and remodeling in postischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 263: H1695-H1702.

170. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. 1999. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 276: E1-E18.
171. Saddik M, Lopaschuk GD. 1994. Triacylglycerol turnover in isolated working hearts of acutely diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 1110-1119.
172. Saddik M, Lopaschuk GD. 1991. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *J. Biol. Chem.* 266: 8162-8170.
173. Saffari B, Ong JM, Kern PA. 1992. Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by the thyroid hormone in rats. *J. Lipid Res.* 33: 241-249.
174. Saggerson D, Ghadimejad I, Awan M. 1992. Regulation of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase from liver and extrahepatic tissues. *Adv Enzyme Regul* 32: 285-306.
175. Saha AK, Kurowski TG, Ruderman NB. 1995. A malonyl-CoA fuel-sensing mechanism in muscle: effect of insulin, glucose, and denervation. *Am. J. Physiol.* 269: E283-E289.
176. Saha AK, Laybutt Dr, Dean D, Vavvas D, Sebokova E, Ellis B, Klimes I, Kreagen EW, Shafrir E, Ruderman NB. 1999. Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am. J. Physiol.* 276: E1030-E1037.
177. Saha AK, Schwarsin AJ, Roduit R, Masse F, Kaushik V, Tornheim K, Prentki M, Ruderman NB. 2000. Activation of malonylCoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside. *J. Biol. Chem.* 275: 24279-24283.
178. Saha AK, Vavvas D, Kurowski TG, Apazidis A, Witters LA, Shafrir E, Ruderman NB. 1997. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* 272: E641-E648.
179. Schaap FG, Binns B, Danneberg H, Van der Vusse GJ, Glatz JFC. 1999. Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice lacking the heart-type fatty acid binding protein gene. *Circ. Res.* 85: 329-337.
180. Schnitzer JE. and Oh P. 1992. Antibodies to SPARC inhibit albumin binding to SPARC, gp60, and microvascular endothelium. *Am. J. Physiol.* 263: H1872-H1879.
181. Schnitzer JE. and Oh P. 1994. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J. Biol. Chem.* 269: 6072-6082.
182. Schoonderwoerd K, Broekhoven-Schokker S, Hulsmann WC, Stam H. 1989.

Enhanced lipolysis of myocardial triglycerides during low-flow ischemia and anoxia in isolated rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 84: 165-173.

183. **Schoonderwoerd K, Broekhoven-Schokker S, Hulsmann WC, Stam H. 1990.** Properties of phosphatidate phosphohydrolase and diacylglycerol acyltransferase activities in the isolated rat heart. Effect of glucagon, ischemia and diabetes. *Biochem. J.* 268: 487-492.
184. **Shimizu S, Inoue K, Tani Y, Yamada H. 1979.** Enzymatic microdetermination of serum free fatty acids. *Analytical Biochem.* 98: 341-345.
185. **Short KR, Nygren J, Barazzoni R, Levine J, Nair KS. 2001.** T(3) increases mitochondrial ATP production in oxidative muscle despite increased expression of UCP2 and -3. *Am. J. Physiol.* 280: E761-E769.
186. **Sidossis LS, Coggan AR, Gastaldelli A, Wilfe RR. 1995.** Pathway of free fatty acid oxidation in human subjects: implications for tracer studies. *J. Clin. Invest.* 95: 278-284.
187. **Sidossis LS, Stuart CA, Shulman GI, Lopaschuk GD, Wolfe RR. 1996.** Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *J. Clin. Invest.* 98: 2244-2250.
188. **Sillau AH. 1984.** Capilarity, oxidative capacity and fibre composition of the soleus and gastrocnemius muscles of rats in hypothyroidism. *J Physiol* 361: 281-295.
189. **Simonides WS, and Van Hardeveld C. 1987.** Effect of hypothyroidism on the distribution and fatty acyl composition of phospholipids in sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 924: 204-209.
190. **Sjogaard G. 1979.** Water spaces and electrolyte concentrations in human skeletal muscle. PhD. thesis, University of Copenhagen,
191. **Sorrentino D, Robinson RB, Kiang C, Berk PD. 1989.** At physiologic albumin/oleate concentrations oleate uptake by isolated hepatocytes, cardiac myocytes, and adipocytes is a saturable function of the unbound oleate concentration. Uptake kinetics are consistent with the conventional theory. *J. Clin. Invest.* 84: 1325-1333.
192. **Sorrentino D, Stump D, Potter BJ, Robinson RB, White R, Kiang CL, Berk PD. 1988.** Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40-kD plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue, and gut. *J. Clin. Invest.* 82: 928-935.
193. **Staalfors P, Olsson H, Belfrage P. 1987.** *Enzymes* Wyd. III. 18 str: 147-177.

194. **Stakkestad JA. and Bremer J. 1983.** The outer carnitine palmitoyltransferase and regulation of fatty acid metabolism in rat liver in different thyroid states. *Biochim. Biophys. Acta* 750: 244-252.
195. **Storch J. and Thumser AEA. 2000.** The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1486: 28-44.
196. **Sugden MC. and Holness MJ. 1994.** Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine palmitoyltransferase system. *FASEB J.* 8: 54-61.
197. **Sugden MC, Bulmer K, Holness MJ. 2001.** Fuel-sensing mechanisms integrating lipid and carbohydrate utilization. *Biochem. Soc. Trans.* 29: 272-278.
198. **Sugden MC, Lall HS, Harris RA, Holness MJ. 2000 a.** Selective modification of the pyruvate dehydrogenase kinase isoform profile in skeletal muscle in hyperthyroidism: implications for the regulatory impact of glucose on fatty acid oxidation. *J. Endocrinol.* 167: 339-45.
199. **Sugden MC, Kraus A, Harris RA, Holness MJ. 2000 b.** Fibre-type specific modification of the activity and regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) by prolonged starvation and refeeding is associated with targeted regulation of PDK isoenzyme 4 expression. *Biochem. J.* 346: 651-657.
200. **Sugden MC, Priestman DA, Orfali KA, Holness MJ. 1999.** Hyperthyroidism facilitates cardiac fatty acid oxidation through altered regulation of cardiac carnitine palmitoyltransferase: studies in vivo and with cardiac myocytes. *Horm. Metab. Res.* 31: 300-306.
201. **Swanton EM. and Saggerson ED. 1997a.** Glycerolipid metabolizing enzymes in rat ventricle and in cardiac myocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1346: 93-102.
202. **Swanton EMS, Saggerson ED. 1997b.** Effect of adrenaline on triacylglycerol synthesis and turnover in ventricular myocytes from adult rats. *Biochem. J.* 328: 913-922.
203. **Tata JR, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pedersen S, Hedman R. 1963.** The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem. J.* 86: 408-428.
204. **Terjung RL. Koerner JE. 1976.** Biochemical adaptations in skeletal muscle of trained thyroidectomized rats. *Am. J. Physiol.* 230: 1194-1197.
205. **Terjung RL, Budohoski L, Nazar K, Kobryn A. Kaciuba-Uścilko H. 1982.** Chylomicron triglyceride metabolism in resting and exercise fed dogs. *J. Appl. Physiol.* 52: 815-820.

206. Terjung RL, Mackie BG, Dudley GA, Kaciuba-Uściłko H. 1983. Influence of exercise on chylomicron triacylglycerol metabolism: plasma turnover and muscle uptake. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15: 340-347.
207. Thompson CH, Anderson Y, Jagasia DH, Radda GK, Rajagopalan B. 1993. Effect of tri-iodothyronine administration on skeletal muscle intracellular pH in the rat. *Clin. Sci.* 84: 645-649.
208. Tome Y, Hirohashi S, Noguchi M, Shimasoto Y. 1990. Preservation of cluster 1 small cell lung cancer antigen in zinc-formalin fixative and its application to immunohistological diagnosis. *Histopathology* 16: 469-474.
209. Trigatti BL and Gerber GE. 1995. A direct role for serum albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids. *Biochem. J.* 308: 155-159.
210. Trumble GE, Smith MA, Winder WW. 1995. Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *Eur. J. Biochem.* 231: 192-198.
211. Turcotte LP, Hespel PJ, Graham TE, Richter EA. 1994. Impaired plasma FFA oxidation imposed by extreme CHO deficiency in contracting rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 77: 517-525.
212. Turcotte L, Swenberg JR, Tucker MA, and Yee AJ, Trump G, Luiken JJFP, Bonen A. 2000. Muscle palmitate uptake and binding are saturable and inhibited by antibodies to FABP_{PM}. *Mol. Cell. Biochem.* 210: 53-63.
213. Turcotte LP, Swenberg JR, Tucker MA, and Yee AJ. 1999. Training-induced elevation in FABP_{pm} ins asociated with increased palmitate use in contracting muscle. *J. Appl. Physiol.* 87:285 – 293.
214. Turcotte LP, Srivastava AK, Chiasson JL. 1997. Fasting increases plasma membrane fatty acid binding protein (FABP_{PM}) in red skeletal muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 166: 153-158.
215. Turcotte LP, Kiens B, Richter EA. 1991. Saturation kinetics of palmitate uptake in perfused skeletal muscle. *FEBS Lett.* 279: 327 – 329.
216. Turcotte LP, Swenberger JR, Yee AJ. 2002. High carbohydrate availability increases LCFA uptake and decreases LCFA oxidation in perfused muscle. *Am. J. Physiol.* 282: E177-E183.
217. Turcotte LP, Hespel PJJ, Graham TE, Richter EA. 1994. Impaired plasma FFA oxidation imposed by extreme CHO deficiency in contracting rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 77: 517-525.
218. Turcotte LP, Swenberger JR, Tucker MZ, Yee AJ. 2001. Increased fatty acid

- uptake and altered fatty acid metabolism in insulin-resistant muscle of obese Zucker Rats. *Diabetes* 50: 1389-1396.
- 219. Van der Lee KAJM, Vork MM, De Vries JE, Willemsen PHM, Glatz JFC, Reneman RS, Van der Vusse GJ, and Van Bilsen M. 2000.** Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J. Lipid Res.* 41: 41-47.
- 220. Van der Vusse GJ, Glatz JFC, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Bassingthwaite JB. 1998.** Transport of long-chain fatty acids across the muscular endothelium. W: *Skeletal muscle metabolism in exercise and diabetes*. Wyd. Plenum Press, New York, str: 181-191.
- 221. Van der Vusse GJ. and Reneman RS. 1996.** Lipid metabolism in muscle. W: *Handbook of Physiology*, section 12- Regulation and integration of multiple systems. Wyd. Rowell LB, Sheperd NY, Oxford Press, New York, str. 952-994.
- 222. Van der Vusse GJ, Roemen THM, Flameng W, Reneman RS. 1983.** Serum-myocardium gradients of non-esterified fatty acids in dog, rat and men. *Biochim. Biophys. Acta* 752: 361-370.
- 223. Van der Vusse GJ. and Roemen THM. 1995.** Gradient of fatty acids from blood plasma to skeletal muscle in dogs. *J. Appl. Physiol.* 78: 1839-1843.
- 224. Van Hardeveld C. and Kassenaar AAH. 1977.** Influence of experimental hyperthyroidism on skeletal muscle metabolism in the rat. *Acta Endocrinol.* 85: 71-83.
- 225. Van Nieuwenhoven FA, Willemsen PHM, Van der Vusse GJ, Glatz JFC. 1999.** Co-expression in rat heart and skeletal muscle of four genes coding for proteins implicated in long-chain fatty acid uptake. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 489-498.
- 226. Van Nieuwenhoven FA, Verstijnen CP, Abumrad NA, Willemsen PH, Van Eys GJ, Van der Vusse GJ, Glatz JF. 1995.** Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207: 747-52.
- 227. Vila MC, Milligan G, Standaert ML, Farese RV. 1990.** Insulin activates glycerol-3-phosphate acyltransferase (de novo phosphatic acid synthesis) through a phospholipid-derived mediator. Apparent involvement of Gi alpha and activation of a phospholipase C. *Biochemistry* 29: 8735-8740.
- 228. Vogel G. and Stoeckert I. 1963.** *Pflugers Arch.* 277: 236.
- 229. Weisiger R, Gollan J, Ockner R. 1981.** Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. *Science* 211:

13395-13401.

- 230. Wiig H, Reed RK, Tenstad O. 2000.** Interstitial fluid pressure, composition of interstitium, and interstitial exclusion of albumin in hypothyroid rats. *Am. J. Physiol.* 278: H1627-H1639.
- 231. Wilcox HG, and Heimberg M. 1991.** Effects of hyperthyroidism on synthesis, secretion and metabolism of the VLDL apoproteins by the perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1081: 246-252.
- 232. Williams RS, Caron MG, Daniel K. 1984.** Skeletal muscle beta-adrenergic receptors: variations due to fiber type and training. *Am. J. Physiol.* 246: E160-E167.
- 233. Winder WW, Baldwin KM, Terjung RL, Holloszy JO. 1975.** Effects of thyroid hormone administration on skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Physiol.* 228:1341-1345.
- 234. Winder WW. and Hardie DG. 1996.** Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am. J. Physiol.* 270: E299-E304.
- 235. Winder WW. and Holloszy JO. 1977.** Response of mitochondria of different types of skeletal muscle to thyrotoxicosis. *Am. J. Physiol.* 232: C180-C184.
- 236. Winder WW. 1979.** Time course of the T₃- and T₄-induced increase in rat soleus muscle mitochondria. *Am. J. Physiol.* 236: C132-C138.
- 237. Winder WW. and Holmes BF. 2000.** Insulin stimulation of glucose uptake fails to decrease palmitate oxidation in muscle if AMPK is activated. *J. Appl. Physiol.* 89: 2430-2437.
- 238. Wu P, Inskeep K, Bowker-Kinley MM, Popov KM, Harris RA. 1999.** Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. *Diabetes* 48: 1593-1599.
- 239. Yen PM. 2001.** Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81: 1097-1142.
- 240. Young ME, Goodwin GW, Ying J, Guthrie P, Wilson CR, Laws FA, Taegtmeier H. 2001.** Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl-CoA decarboxylase by fatty acids. *Am. J. Physiol.* 280: E471-E479.
- 241. Zhou SL, Stump D, Sorrentino D, Potter BJ, Berk PD. 1992.** Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 267: 14456-14461.
- 242. Żendzian-Piotrowska M, Górska M, Dworakowski W, Górski J. 2000.** Effect of

triiodotyronine on phospholipid metabolism in skeletal muscle of the rat. *J. Physiol. Pharmacol.* 51: 103-110.

- 243. Żernicka E. 1999.** Wpływ doświadczalnej niedoczynności i nadczynności tarczycy na aktywność lipazy lipoproteinowej oraz zawartość triacylogliceroli w mięśniach szczura w spoczynku i po wysiłku fizycznym. Rozprawa doktorska wykonana w Zakładzie Fizjologii Stosowanej I-CMDiK, PAN, Warszawa.