

**Marcin Synak**

**Wpływ zwiększonej dostępności kwasów tłuszczowych na syntezę  
acylogliceroli w mięśniach szkieletowych o różnym składzie  
włókien – badania in situ.**

Rozprawa doktorska  
wykonana w  
Zakładzie Fizjologii Stosowanej  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej  
Akademii Nauk

Promotor:  
Prof. dr hab. Hanna Kaciuba-Uściłko



25 224  
H3037

**Warszawa 2002**

Składam serdeczne podziękowania Pani Profesor Hannie Kaciubie-Uściłko za wszechstronną pomoc, rozwiewanie wątpliwości, cenne wskazówki udzielone podczas przygotowywania tej rozprawy i motywowanie do pracy.

Dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizjologii Stosowanej IMDiK PAN bez których praca ta nie mogłaby powstać.

Dziękuję również mojej Małgosi i Basi.

## Spis treści

1.	Wykaz stosowanych skrótów	2
2.	Wstęp	3
2.1.	Wychwyty kwasów tłuszczowych związanych i niezwiązanych z albuminą	6
2.2.	Transport kwasów tłuszczowych przez błony komórkowe	10
2.2.1.	Bierna dyfuzja	10
2.2.2.	Transport ułatwiony	14
2.2.3.	Białka wiążące kwasy tłuszczowe zlokalizowane w błonie komórkowej	17
2.2.4.	Współistnienie dyfuzji biernej i dyfuzji ułatwionej w procesie wychwytywania kwasów tłuszczowych	21
2.3.	Wbudowywanie kwasów tłuszczowych w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe	23
2.4.	Wybrane czynniki wpływające na metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych	26
2.4.1.	Wpływ ekspozycji na niską temperaturę otoczenia	26
2.4.2.	Wpływ krótkotrwałego głodzenia	27
3.	Założenia i cele pracy	31
4.	Materiał i metody	33
5.	Wyniki	44
5.1.	Wbudowywanie kwasu palmitynowego w lipidy wewnątrzmięśniowe w zależności od czasu trwania perfuzji	44
5.2.	Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w zależności od stężenia kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym.	48
5.3.	Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w wybranych sytuacjach: u szczurów poddanych ekspozycji na niską temperaturę otoczenia lub pozbawionych pokarmu	60
6.	Dyskusja	69
7.	Podsumowanie i wnioski	89
8.	Streszczenie	91
9.	Piśmiennictwo	96

## 1. Wykaz stosowanych skrótów

ABP - Białko wiążące albuminę  
ACC - Karboksylaza acylo-CoA  
ADP - Adenozynodifosforan  
AMP - Adenozynomonofosforan  
AMPK - Kinaza białkowa aktywowana AMP  
ATP - Adenozynotrifosforan  
CoA - Koenzym A  
CPT-I - Acylotransferaza karnitynowa I  
DG - Diacyloglicerol  
FABPc - Cytosolowe białko wiążące kwasy tłuszczowe  
FABPpm - Błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe  
FAT - Translokaza kwasów tłuszczowych  
FATP - Białko transportujące kwasy tłuszczowe  
H-FABP - Białko wiążące kwasy tłuszczowe serca  
HFS - Kwas  $\alpha_2, \beta_2, \omega_3$ -heptafluorostearynowy  
HSL - Lipaza hormonozależna  
KP - Kwas palmitynowy  
KT - Kwas tłuszczowy  
LPL - Lipaza lipoproteinowa  
MCD - Dekarboksylaza malonylo-CoA  
MG - Monoacyloglicerol  
MGSL - Lipaza hydrolizująca monoacyloglicerole  
mRNA - Informacyjny kwas rybonukleinowy  
NKP - Niezwiązany z albuminą kwas palmitynowy  
NKT - Niezwiązany z albuminą kwas tłuszczowy  
PL - Fosfolipid  
PPAR - Proliferator peroksysomów  
SUV - Mały liposom  
TG - Triacyloglicerol  
UCP - Białko rozprzegające

## 2. Wstęp

Kwasy tłuszczowe (KT) pełnią w organizmach żywych wiele istotnych funkcji, między innymi, są wykorzystywane jako substraty energetyczne w procesie  $\beta$ -oksydacji, stanowią element budulcowy fosfolipidów, z których tworzone są błony biologiczne, są też prekursorami tak ważnych mediatorów biologicznych jak prostaglandyny, leukotrieny i tromboksany (Berk i Stump, 1999). KT zaangażowane są także w wewnątrzkomórkowe przekazywanie informacji, biorą również udział w procesach post-transkrypcyjnej modyfikacji białek (Luiken i wsp., 1999a; Memon i wsp., 1998).

W organizmie, KT magazynowane są w tkance tłuszczowej w postaci triacylogliceroli (TG). W razie potrzeby następuje hydroliza TG i KT zostają uwalniane do krwiobiegu, z którego następnie wychwytywane są przez różne tkanki. Wewnątrzkomórkowe TG obecne są także między innymi w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym. Innym ważnym źródłem KT są triacyloglicerole lipoprotein osocza, których hydroliza przez lipazę lipoproteinową (LPL) prowadzi do uwolnienia KT do krwiobiegu.

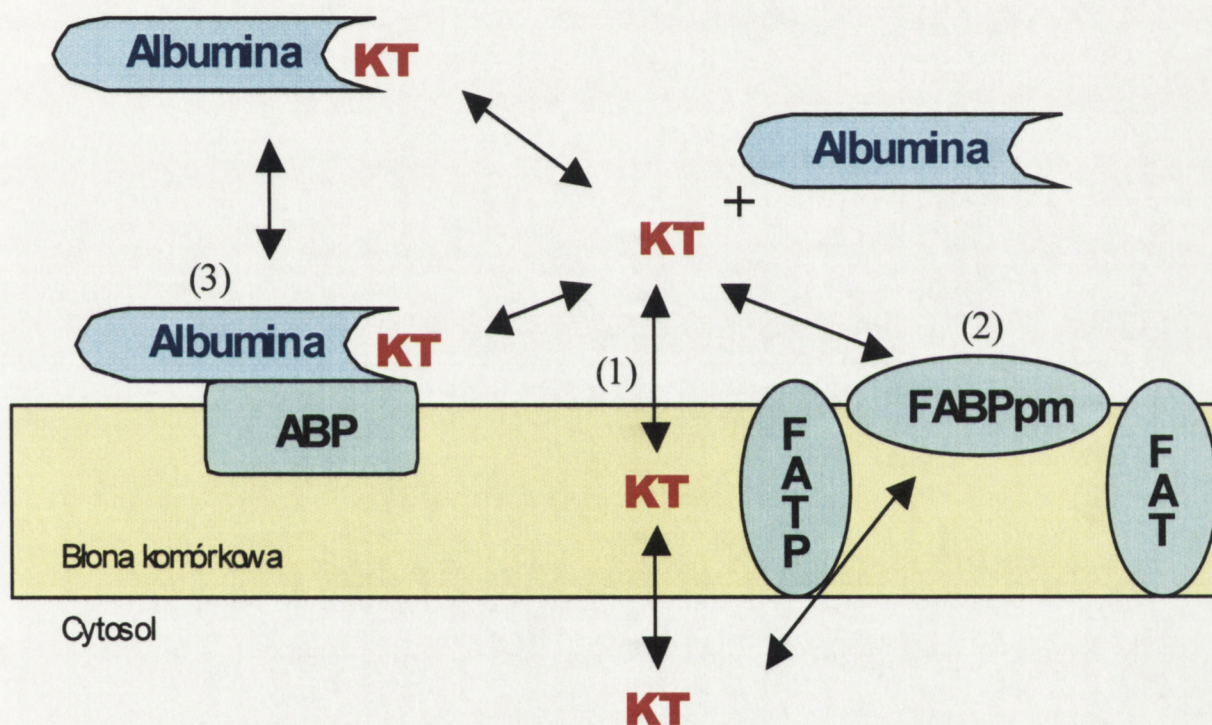
KT, podobnie jak inne lipidy, nie rozpuszczają się w roztworach wodnych. Przy stężeniach rzędu 5-10  $\mu$ M KT zaczynają tworzyć agregaty (Rose i wsp., 1990). We krwi KT transportowane są przez białka osocza - albuminy. U człowieka stężenie albuminy we krwi wynosi około 0,6 mM, natomiast stężenie KT - w zależności od stanu fizjologicznego - waha się w granicach 0,2-1,0 mM (Van der Vusse i Reneman, 1996). Kompleks albumina-KT pozostaje w równowadze z bardzo małą frakcją KT rozpuszczonych w osoczu (poniżej 0,01% puli całkowitej). Pulę tę określa się terminem "niezwiązane kwasy tłuszczowe" (NKT). Pojedyncza cząsteczka albuminy zawiera około 10 miejsc wiążących KT, przy czym powinowactwo albuminy do KT zmniejsza się wraz z zapelnianiem kolejnych miejsc wiążących (Richieri i Kleinfeld, 1995). Wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KT we krwi, przy zachowanym stężeniu albuminy, czyli wraz ze wzrostem stosunku całkowitego stężenia KT do stężenia albuminy, pula NKT rośnie szybko, a charakter tych zmian ma przebieg eksponencjalny (Richieri i Kleinfeld, 1995). W

konsekwencji, albumina pełni nie tylko rolę czynnika umożliwiającego transport KT przez krew oraz zabezpieczającego przed toksycznym dla organizmu wpływem wysokiego stężenia KT, ale także czułego modulatora stężenia NKT.

Ze względu na swoją dużą masę w organizmie mięśnie szkieletowe są jedną z najważniejszych tkanek metabolizujących KT (Dyck i wsp., 1997). Kwasy tłuszczowe są wychwytywane i zużywane przez mięśnie zarówno w spoczynku jak i w czasie wysiłku fizycznego. Ich względny udział w zaspokajaniu potrzeb energetycznych podczas pracy mięśniowej zależy od wielu czynników, m.in. od intensywności wysiłku fizycznego, czasu jego trwania, stopnia wytrenowania czy stosowanej diety (Van der Vusse i Reneman, 1996). W spoczynku ponad 50% zapotrzebowania energetycznego organizmu pokrywane jest przez kwasy tłuszczowe (Gollnick i Saltin, 1988) z czego ponad 90% przypada na egzogenne KT (Dyck i wsp., 1997). Podczas wysiłku o małej i umiarkowanej intensywności wykorzystanie kwasów tłuszczowych wzrasta (Romijn i wsp., 1993), natomiast podczas wysiłku o dużej intensywności (powyżej 80-90% maksymalnego pobierania tlenu,  $VO_{2max}$ ) wykorzystywanie kwasów tłuszczowych przez mięśnie znacząco się zmniejsza (Romijn i wsp., 1995), a rolę głównego substratu energetycznego przejmuje glukoza.

Trening fizyczny zwiększa wykorzystywanie KT przez mięśnie szkieletowe podczas wysiłku (Klein i wsp., 1994). KT jako substraty energetyczne są bardziej efektywne niż glukoza ponieważ całkowite utlenienie jednego mola kwasu palmitynowego prowadzi do powstania 130 moli adenosynotryfosforanu (ATP) podczas gdy utlenienie 1 mola glukozy tylko do 38 moli ATP. Jednakże, w porównaniu z glukozą, utlenianie KT wymaga zużycia większej ilości tlenu (Grynberg i Demaison, 1996). KT jako substraty energetyczne są również w znacznej mierze wykorzystywane przez mięsień sercowy. W warunkach normalnych serce człowieka uzyskuje 60-70% potrzebnej mu energii z procesu  $\beta$ -oksydacji, a w warunkach głodu udział ten rośnie nawet do 80-90%. Wychwyt KT przez serce jest bardzo efektywny, ocenia się, że podczas pojedynczego przejścia krwi przez ten organ wychwytywane jest około 30% KT

(Luiken i wsp., 1999a). W wartościach absolutnych wychwyty KT przez serce wynosi 60-120 nmol x g<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup> (Van der Vusse i wsp., 1992). Szacuje się, że podobnego rzędu jest wychwyty KT przez włókna tlenowe i tlenowo-glikolityczne mięśni szkieletowych w czasie wysiłku (Van der Vusse i wsp., 1998).



Ryc. 1

Schemat mechanizmów wychwyty kwasów tłuszczowych przez komórki (na podstawie ryciny zamieszczonej w pracy Luikena i wsp., 1999a): (1) bierna dyfuzja, (2) wychwyty ułatwiony przez białka wiążące kwasy tłuszczowe (FABPpm, FAT, FATP), (3) wychwyty wspomagany przez bezpośrednie oddziaływanie kompleksu albumina-KT z białkiem wiążącym albuminę.

KT - Kwas tłuszczowy

ABP - Białko wiążące albuminę / receptor albuminowy

FABPpm - Błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe

FAT - Translokaza kwasów tłuszczowych

FATP - Białko transportujące kwasy tłuszczowe

## 2.1. Wychwył kwasów tłuszczowych związanych i niezwiązanych z albuminą

### Pula kwasów tłuszczowych związanych z albuminą

Ze względu na to, iż we krwi znajdują się dwie pule KT, to znaczy kwasy związane i niezwiązane z albuminą (Ryc. 1) rodzi się pytanie, która z nich jest bardziej istotna z punktu widzenia wychwytu KT przez mięśnie (Van der Vusse i wsp., 1998).

Przez wiele lat powszechnie uznawany był pogląd, że wychwył KT zależy od ich całkowitego stężenia we krwi. Na poparcie tego twierdzenia przytaczano wyniki doświadczeń, w których stwierdzano istnienie liniowej współzależności pomiędzy wychwytem KT przez mięśnie szkieletowe człowieka, a ich stężeniem w osoczu (Van der Vusse i Reneman, 1996). Istnienie tej zależności wykazano także w mięśniach szkieletowych szczura stosując technikę perfuzji kończyn tylnych (Reimer i wsp., 1975). Należy zaznaczyć, że całkowite stężenie KT jest ilościowo praktycznie tożsame ze stężeniem KT związanych z albuminą, tak więc istnienie wspomnianej wyżej współzależności sugerowałoby istotną rolę puli KT związanych z albuminą. Z drugiej strony wydawało się, że dysocjacja KT z kompleksu albumina-KT może być zbyt wolna aby zapewnić wystarczającą ilość kwasów tłuszczowych w stosunku do wychwytu (Van der Vusse i Reneman, 1996), szczególnie w warunkach, w których przepływ krwi jest bardzo szybki (Van der Vusse i wsp., 1992).

Rola kompleksu albumina-KT w komórkowym wychwyte KT była przedmiotem intensywnych badań szczególnie w hepatocytach, w których stwierdzono, że wychwył nie zależy od stężenia NKT (Burczynski i Cai, 1994). Stwierdzono także, że izolowane hepatocyty wychwyłują z kompleksu albumina-KT kilkakrotnie więcej KT niż membrana polietylenowa, będąca dobrym akceptorem KT (patrz: Burczynski i Cai, 1994). Różnic takich nie obserwowano przy braku albuminy co wskazuje na istnienie oddziaływania pomiędzy hepatocytami i kompleksem albumina-KT ułatwiającego przechodzenie KT z albuminy do komórek. Wykazano też, że wraz ze zwiększaniem stężenia kompleksu albumina-KT zwiększa się wychwył KT (Burczynski i Cai, 1994). Wzrost wychwytu kwasu



oleinowego wraz ze wzrostem stężenia kompleksu albumina-KT opisano również w adipocytach 3T3-L1 (Trigatti i Gerber, 1995). Zależność tę autorzy odnotowali także przy wysokich stosunkach stężeń kwasu oleinowego do albuminy, czyli wówczas gdy stężenie NKT jest wysokie. Stosując albuminę kowalencyjnie związaną ze znakowaną trytem pochodną kwasu undekanowego autorzy stwierdzili, że wiąże się ona ze ścianą komórkową. W kardiomiocytach z kolei wykazano (Hutter i wsp., 1984, Rauch i wsp., 1987), że wraz z jednoczesnym wzrostem stężenia albuminy i stężenia kwasu palmitynowego, czyli przy stałym stężeniu NKT, utlenianie KT wzrasta, przy czym proces ten wykazuje tendencję do wysycania się. Wskazywałoby to, że przy wysokich stężeniach kompleksu albumina-KT następuje zapełnianie się miejsc oddziałujących z albuminą w ścianie komórkowej kardiomiocytów. Gdy zwiększano tylko stężenie albuminy przy niezmiennym stężeniu całkowitym kwasu palmitynowego odnotowano zmniejszanie się utleniania. Wynik ten można by tłumaczyć kompetycyjnym blokowaniem dostępu dla cząsteczek kompleksu albumina-KT do miejsc w ścianie komórkowej oddziałujących z kompleksem przez cząsteczki albuminy pozbawione KT. Zgodne z powyższym są także wyniki uzyskane przez Luikena i wsp. (1997), którzy stwierdzili, że wychwytywanie KT przez izolowane kardiomiocyty wzrasta i wysycza się zarówno wraz ze wzrostem stężenia NKT jak i wówczas, gdy przy zachowanym stałym stosunku stężenia KT i albuminy zwiększa się stężenie kompleksu albumina-KT.

Istnienie w błonie komórkowej hepatocytów miejsc oddziałujących z kompleksem albumina-KT i ułatwiających wychwytywanie kwasów tłuszczowych zaproponował już w 1981 roku Weisiger i wsp. W połowie lat osiemdziesiątych obecność receptorów albuminowych w sarkolemie kardiomiocytów postulowali z kolei Rauch i wsp. (1987). Przypuszczalnie, mogą nimi być białka wiążące albuminę (albumin-binding proteins - ABP) odpowiedzialne także za transport albuminy przez śródbłonek za pośrednictwem transcytozy (Schnitzer i Oh, 1994). Istnienie takich białek stwierdzono w hodowanych komórkach śródbłonek (Antohe i wsp., 1993) oraz w komórkach innych tkanek, między innymi w kardiomiocytach, miocytach, adipocytach i hepatocytach (Schnitzer i wsp., 1992). Jak

obliczono, wartość stałej Michaelisa-Menten,  $K_m$  dla oddziaływania albuminy z tymi białkami wynosi 0,2 mM (Van der Vusse i wsp., 1998). Zatem, w warunkach fizjologicznych, przy stężeniu albuminy rzędu 0,6 mM, wszystkie miejsca wiążące albuminę są wysyczone tak więc wychwytywanie KT będzie wówczas zależało od liczby cząsteczek KT przypadających na jedną cząsteczkę albuminy.

### **Puła kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą (NKT)**

Inny pogląd, opierający się na teorii wychwytywania przez komórki ligandów związanych z białkami (Turcotte, 1998) i przeciwny do omówionego w poprzednim podrozdziale, głosi, że w procesie wychwytywania KT biorą udział jedynie cząsteczki NKT podczas gdy frakcja KT pozostająca w kompleksie z albuminą pełni rolę „magazynu” uzupełniającego pulę NKT (Burczynski i Cai, 1994). Pogląd ten znajduje poparcie w wynikach licznych prac doświadczalnych, między innymi Rose i wsp. (1990), którzy badając izolowane kardiomiocyty stwierdzili, że wychwytywanie kwasu palmitynowego zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia NKT, natomiast nie zmienia się, gdy wzrasta stężenie całkowitego kompleksu albumina-KT. Koncepcję taką potwierdzono także w badaniach na izolowanych hepatocytach, kardiomiocytach i adipocytach (Bonen i wsp., 1998a). Również, Kvilekval i wsp. (1994) wykazali, że synteza triacylogliceroli i estrów cholesterolu w izolowanych hepatocytach zależy wyłącznie od stężenia NKT. Autorzy ci stwierdzili, że dla danego stężenia NKT uzyskanego zarówno wówczas gdy przy stałym stężeniu albuminy w medium inkubacyjnym zmieniano całkowite stężenie kwasu oleinowego, jak i wówczas gdy przy stałym całkowitym stężeniu kwasu oleinowego zmieniano stężenie albuminy wbudowywanie tego kwasu w lipidy wewnątrzkomórkowe było identyczne.

Rodzi się jednak wątpliwość czy wobec tego, że w warunkach fizjologicznych stężenie NKT we krwi jest bardzo niskie w porównaniu z ilością KT wychwytywanych przez komórki, puła KT w kompleksie z albuminą jest w stanie efektywnie uzupełniać pulę NKT. Co więcej, albumina wykazuje wysokie powinowactwo do KT ( $K \sim 10^{-7} \text{ mol}^{-1}$ ),

można by się więc spodziewać, że spontaniczna dysocjacja kompleksu może być nie wystarczająca (Van der Vusse i Reneman, 1996). Jak podkreśla Hamilton (1998), analizując ten problem w układach biologicznych należy uwzględnić obecność KT w błonach komórkowych, to znaczy rozpatrywać układ trójfazowy: kompleks albumina-KT, pulę NKT oraz KT znajdujące się w błonie biologicznej. Uwzględniając taki układ istotną będzie odpowiedź na pytanie jakie jest względne powinowactwo albuminy i błony biologicznej do KT oraz czy proces dysocjacji kompleksu albumina-KT jest wystarczająco szybki aby efektywnie uzupełnić pulę NKT. Stosując technikę spektroskopii  $^{13}\text{C}$ -NMR stwierdzono, że wzbogacony w węgiel  $^{13}\text{C}$  kwas oleinowy spontanicznie przechodzi z albuminy wołowej do liposomów fosfolipidowych, oraz że półokres trwania ( $t_{1/2}$ ) tego procesu wynosi poniżej 1 minuty (Hamilton, 1998). Stwierdzono także, że obniżenie pH fazy wodnej zwiększa przechodzenie kwasu oleinowego z kompleksu do błony. W dalszych, bardziej precyzyjnych badaniach wykazano, że  $t_{1/2}$  dla kwasu oktanowego i dekanowego wynosi odpowiednio tylko 2 i 35 milisekund (Hamilton, 1998).

Powyżej cytowane wyniki pozwalają więc sądzić, że spontaniczny rozpad kompleksu albumina-KT i przechodzenie KT do błon fosfolipidowych jest, pomimo znacznego powinowactwa albuminy do KT, procesem szybkim, pozwalającym zapewnić wystarczającą ilość KT dla potrzeb metabolizmu komórkowego. Dane te wskazują także, że KT mogą być efektywnie wychwytywane bezpośrednio z puli NKT, natomiast nie wydaje się konieczna obecność białek wspomagających rozpad kompleksu albumina-KT czy też ułatwiających wychwyt KT. Konieczności udziału białek błonowych nie można jednak całkowicie wykluczyć, gdyż w układach biologicznych dostęp do błon komórkowych dla KT może być utrudniony przez inne białka błonowe oraz glikokaliks, a cały proces może być znacznie bardziej skomplikowany niż w przypadku prostych błon fosfolipidowych (Hamilton 1998). Wówczas to KT pozostające w kompleksie z albuminą mogą być nie tylko rezerwuarem uzupełniającym pulę NKT, ale także brać bezpośredni udział w procesie wychwytu KT przez komórki szczególnie w przypadku wyższych całkowitych stężeń KT.

## 2.2. Transport KT przez błony komórkowe

Kolejnym zagadnieniem, które było przedmiotem intensywnych badań w ostatnich latach jest sposób w jaki KT pokonują błony komórkowe aby wejść do wnętrza komórki.

Ze względu na to, że KT mogą swobodnie przenikać przez błony komórkowe przez wiele lat utrzymywał się pogląd, że wychwytywanie KT odbywa się na zasadzie biernej dyfuzji (Ryc. 1), której siłą napędową jest różnica stężeń na zewnątrz i wewnątrz komórki (Kamp i wsp., 1995). Obecnie, coraz więcej badaczy uważa, że wychwytywanie KT jest wspomagane, przynajmniej w części, przez białka transportujące (Ryc. 1) zlokalizowane w błonach komórkowych (Bonen i wsp., 1998a).

### 2.2.1. Bierna dyfuzja

#### Szybkość procesu

Dyfuzja KT poprzez błony fosfolipidowe liposomów (small unilamellar vesicles - SUV), utworzonych z oczyszczonych z białek fosfatydylocholin jaja kurzego, została stwierdzona między innymi przez Kampa i Hamiltona (1993). Zmierzony przez autorów półokres trwania ( $t_{1/2}$ ) tego procesu dla badanych KT (o długości łańcucha 8-20 grup metylenowych) był krótszy niż 1 s.

Proces przenikania KT przez błony podwójne obejmuje co najmniej 3 etapy (Hamilton, 1998): asocjację z błoną zewnętrzną, przechodzenie z zewnętrznej do wewnętrznej strony błony i desocjację z błony.

Pierwszy etap jest procesem szybkim czego dowodzą omówione w poprzednim rozdziale badania fizykochemiczne. W zakresie fizjologicznych wartości pH KT znajdują się w postaci zdysocjowanej, co powoduje konieczność pokonania przez nie przeciwnego gradientu elektrycznego, wytworzonego przez skierowane na zewnątrz błony grupy polarne fosfolipidów błonowych. Mogłoby to potencjalnie hamować asocjację, chociaż wydaje się, że przynajmniej w świetle badań nad sztucznymi błonami fosfolipidowymi, etap ten nie jest czynnikiem limitującym szybkość całego procesu.

Przypuszczalnie stosunkowo powolny jest drugi etap przechodzenia KT z zewnętrznej do wewnętrznej strony podwójnej błony. Przebieg tego procesu na zasadzie dyfuzji poprzecznej, tzw. "flip-flop" mógłby być trudny w przypadku zdysocjowanych KT ze względu na obecność ujemnego ładunku ich grupy karboksylowej i wymagałby obecności transportera anionowego. Niemniej jednak, jak wykazano za pomocą spektroskopii  $^{13}\text{C}$ -NMR (Hamilton, 1998), w fizjologicznych zakresach pH prawie 50% KT obecnych w błonie fosfolipidowej pozostaje w stanie niezjonizowanym (pKa wynosi około 7,5 niezależnie od długości łańcucha kwasu tłuszczowego). Kamp i Hamilton (1992) zaproponowali model, w którym we "flip-flop" uczestniczą niezdysonizowane cząsteczki KT, a siłę napędową stanowi różnica ich stężeń pomiędzy błonami podwójnej błony. Po wyrównaniu stężeń niezdysonizowane cząsteczki KT uwalniają kationy wodorowe na zewnątrz błony i ustala się nowa równowaga, w której ponownie około 50% cząsteczek jest w stanie zjonizowanym. Poprawność tego modelu została potwierdzona doświadczalnie przy użyciu liposomów zawierających uwięzioną we wnętrzu piraninę - substancję, której fluorescencja zmienia się przy zmianie pH (Kamp i Hamilton, 1992). Stwierdzono, że przechodzenie cząsteczek KT z zewnętrznej do wewnętrznej warstwy błony podwójnej liposomów powoduje obniżenie pH wnętrza liposomów, w wyniku czego zmniejsza się fluorescencja uwięzionej tam piraniny. Zmierzone w ten sposób  $t_{1/2}$  "flip-flop" długołańcuchowych KT wynosiło poniżej 1 s, tak więc "flip-flop" jest procesem szybkim. Potwierdzili to także Wilschut i wsp. (1992) dla kwasu oleinowego oraz Kamp i Hamilton (1993) dla "flip-flop" KT wygenerowanych bezpośrednio w błonie przez hydrolizę fosfolipidów błonowych za pośrednictwem fosfolipazy A2. W późniejszych badaniach, stosując bardziej czuły układ doświadczalny, Kamp i wsp. (1995) stwierdzili, że  $t_{1/2}$  "flip-flop" wynosi poniżej 10 ms i 35 ms odpowiednio dla małych i dużych liposomów.

Zasadność porównywania powyższych wyników z procesami zachodzącymi w układach biologicznych zakwestionowali jednak Berk i Stump (1999). Uważają oni, że na czas "flip-flop" mogą wpływać naprężenia występujące w błonie fosfolipidowej

liposomów, zwiększając jej przepuszczalność w stosunku do KT. W konsekwencji, w przypadku błon komórkowych czas "flip-flop" może być znacznie dłuższy od obserwowanego w małych i dużych liposomach, a co za tym idzie znacznie niższa ilość KT wychwytywana byłaby za pośrednictwem biernej dyfuzji.

Ostatni etap - desocjacja z błony lipidowej, byłby niekorzystny energetycznie, gdyby KT były uwalniane bezpośrednio do medium polarnego. W układach biologicznych sytuacja taka jednak nie występuje, gdyż obecne są akceptory KT: w osoczu albumina, a w cytosolu białka wiążące kwasy tłuszczowe FABPc (cytosolic fatty acid binding proteins). Zhang i wsp. (1996) badając przechodzenie KT pomiędzy liposomami stwierdzili, że jest ono szybsze dla danego KT niż "flip-flop", przy czym wraz ze zmniejszeniem długości łańcucha bądź zwiększeniem stopnia nienasycenia łańcucha szybkość przechodzenia rośnie. Podobną zależność opisali także Massey i wsp. (1997), którzy oceniali uwalnianie KT z błon lipidowych i ich wychwyt przez albuminę ludzką. Tak więc uwalnianie KT z błony nie wydaje się ograniczać szybkości całego procesu.

Powyższe wyniki pozwalają więc stwierdzić, że przechodzenie KT przez podwójne błony fosfolipidowe jest procesem spontanicznym, szybkim i nie wymaga obecności specjalnego systemu transportującego.

### **Siła napędowa procesu**

Jak wspomniano wyżej, klasyczna koncepcja wychwytu KT za pośrednictwem biernej dyfuzji zakłada, że siłą napędową tego procesu jest różnica stężeń KT w osoczu i w cytosolu, która kieruje KT do wnętrza komórki (Van der Vusse i Reneman, 1996). Istniały jednak trudności z ustaleniem wielkości tej różnicy gdyż o ile stężenie KT w osoczu można było precyzyjnie zmierzyć, to istniały znaczne rozbieżności dotyczące zawartości KT wewnątrz komórek. W niektórych pracach opisywano nawet, że stężenie KT wewnątrz komórek jest wyższe niż w osoczu, na przykład 2,5 mmol/kg tkanki w mięśniach płaszczkowatym szczura (patrz: Górski, 1992). Źródłem tych niezgodności były najprawdopodobniej nieprawidłowe procedury doświadczalne (Górski, 1992), między

innymi obecność KT w przestrzeni międzykomórkowej mogła powodować zawyżanie wyników. Późniejsze badania pozwoliły jednak ustalić, że wewnątrzkomórkowe stężenie KT jest rzędu kilkudziesięciu nmoli/g mokrej tkanki. Van der Vusse i wsp. (1992) uzyskali wartości 50-150 nmol/g mokrej tkanki w sercu, a w dalszych pracach 31 nmol/g mokrej tkanki w mięśniach szkieletowych (Van der Vusse i Roemen, 1995). Obecnie nie budzi więc już wątpliwości fakt, że w warunkach fizjologicznych istnieje duża różnica stężeń KT pomiędzy osoczem i wnętrzem komórki.

Inną hipotezę na temat siły napędowej wychwytu KT zaproponowali Noy i wsp. (1986). Według tych autorów dyfuzja KT do wnętrza komórki jest napędzana nie tyle przez różnicę stężeń po obu stronach sarkolemy, ale przez różnicę stężeń KT między błoną komórkową i cytosolem. Z kolei stężenie KT w sarkolemii zależy od względnego powinowactwa albuminy i błon komórkowych do KT. Hipotezę tę może wspierać fakt, że w mięśniu sercowym oraz prawdopodobnie w mięśniach szkieletowych większość wewnątrzkomórkowych KT zlokalizowana jest w błonach komórkowych, co powoduje powstawanie dużej różnicy ich stężeń pomiędzy sarkolemmą, a cytosolem (Van der Vusse i Reneman, 1996).

Wydaje się ponadto, że podobnie do występującego w osoczu układu: kompleks albumina-KT i NKT, w cytosolu istnieje analogiczny układ: kompleks cytosolowych białek wiążących KT (cytoplasmic fatty acid binding proteins - FABPc) z KT i wewnątrzkomórkowych NKT. Ze względu na to, że - jak cytowano wyżej - rozdział KT pomiędzy osoczem i zewnętrzną błoną podwójnej błony fosfolipidowej, pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną błoną oraz pomiędzy wewnętrzną błoną i cytosolem są procesami równowagowymi w procesie wychwytu KT przez komórki na drodze biernej dyfuzji mamy w istocie do czynienia z szeregiem następujących po sobie procesów równowagowych. W związku z tym nie wydaje się poprawne mówienie, że wychwyt KT następuje na skutek występowania różnicy stężeń KT na zewnątrz i wewnątrz komórki czy pomiędzy stężeniem KT w błonie komórkowej i w cytosolu, gdyż zaburzenie dowolnego elementu tego układu powoduje przepływ KT, aż do ustalenia się nowej

równowagi dynamicznej. Takim zaburzeniem mogłyby być na przykład: zmiana tempa metabolizmu komórkowego, zwiększenie lub zmniejszenie dostępności KT, czy też zmiana zdolności błony komórkowej do akumulacji KT. Zgodne z powyższym byłyby więc wyniki uzyskane przez Luikena i wsp. (1997), którzy stwierdzili, że podanie etomoksiru, czynnika blokującego  $\beta$ -oksydację poprzez blokowanie acylotransferazy karnitynowej I, obniża wychwyty kwasu palmitynowego przez kardiomiocyty szczura o 50%.

### 2.2.2. Transport ułatwiony

Istnienie swoistego systemu transportującego KT przez błonę komórkową sugerują wyniki uzyskane przez Parisa i wsp., którzy jeszcze w 1979 r w hodowanych komórkach mięśnia sercowego embrionów kurzych wykazali hamowanie wychwyty kwasu palmitynowego przez inne KT. Autorzy ci stwierdzili także, że mechanizm wspomagający wychwyty KT nie wymaga energii. Podobne wyniki uzyskali Abumrad i wsp. (1984) badając adipocyty szczura. Stwierdzili oni, że wychwyty KT nie wymaga ATP, oraz że współzawodnictwo wychwyty zachodzi tylko między długołańcuchowymi KT, natomiast nie ma ono miejsca w przypadku krótkołańcuchowych KT, np. kwasu oktanowego. Badając wychwyty pochodnych KT autorzy ci wykazali, że aby zachodził proces współzawodnictwa cząsteczki KT nie mogą mieć zablokowanych grup karboksylowych, a ich łańcuchy węglowodorowe muszą zawierać co najmniej 9 atomów węgla. Istnienie współzawodnictwa w wychwytye KT potwierdzili także Sorrentino i wsp. (1996), którzy badając wychwyty kwasu [ $^3$ H]-oleinowego przez izolowane hepatocyty szczura pod nieobecność i w obecności kwasu palmitynowego wykazali, że w tym drugim przypadku stała Michaelisa-Menten ( $K_m$ ) dla wychwyty kwasu oleinowego wzrosła, natomiast prędkość maksymalna ( $V_{max}$ ) pozostała niezmienną, co jest charakterystyczne dla procesów, w których zachodzi hamowanie kompetycyjne. W inkubowanych liposomach, uzyskanych z błon komórek mięśni szkieletowych, Bonen i wsp. (1998b) również udokumentowali hamowanie (w 65%) wychwyty kwasu



palmitynowego przez nadmiar kwasu oleinowego oraz brak tego efektu przy nadmiarze kwasu oktanowego.

Dodatkowego argumentu przemawiającego za obecnością w błonach komórkowych systemu transportującego KT dostarczyły badania z zastosowaniem pochodnych sulfo-N-bursztyniloimidylowych KT, które nie przechodzą przez błony biologiczne, natomiast kowalencyjnie wiążą się z białkami błonowymi. W adipocytach szczura Harmon i wsp. (1991) stwierdzili, że po podaniu wyżej wspomnianych pochodnych, wychwytywanie KT zmniejsza się o 70%. Potwierdzono to także na modelu perfundowanego serca szczura z użyciem sulfo-N-bursztyniloimidylu palmitynianu (Tanaka i Kawamura, 1995). Bonen i wsp. (1998b) stosując pochodną sulfo-N-bursztyniloimidylową kwasu oleinowego opisali natomiast obniżenie (o 43%) wychwytywania kwasu palmitynowego w liposomach z błon komórkowych mięśni szkieletowych szczura. Ponadto, ci sami autorzy stwierdzili zmniejszenie wychwytywania KT o 50% przez floretinę, inną substancję blokującą białka błonowe, oraz zmniejszenie wychwytywania o 45% przez tripsynę. W izolowanych kardiomiocytach szczura Luiken i wsp. (1997) wykazali blokowanie wychwytywania kwasu palmitynowego przez floretinę i tripsynę w 76-88%. Zmniejszenie o 49% wychwytywania kwasu oleinowego przez tripsynę stwierdzono także w hepatocytach szczura (Stremmel i Berk, 1986).

Wychwytywanie KT przez izolowane hepatocyty, kardiomiocyty i adipocyty (Bonen i wsp., 1998a) wysyca się wraz ze wzrostem stężenia NKT. Zależność taka jest charakterystyczna dla procesów, w których biorą udział transportery. Zaobserwowano ją także na modelu perfundowanej kończyny tylnej szczura badając wychwytywanie KT na podstawie pomiaru różnicy tętniczo-żylniej (Turcotte i wsp., 1991), wbudowywanie KT w wewnątrzmięśniowe TG (Budohoski i wsp., 1996) czy tempo utleniania KT (Turcotte i wsp., 1998). Budohoski i wsp. (1996) stwierdzili ponadto, że mięśnie, w których przeważają włókna tlenowe bądź tlenowo-glikolityczne wychwytyują więcej KT niż mięśnie, w których przeważają włókna glikolityczne, co zostało potwierdzone także na modelu *in vitro* (Dyck i wsp., 1997).

Należy jednak podkreślić, że pomimo, iż stwierdzona doświadczalnie zależność prędkości wychwytu KT od stężenia NKT wykazuje tendencję do wysycania się wraz ze wzrostem stężenia NKT, samo wykazanie takiej zależności nie rozstrzyga, czy to właśnie na etapie transportu przez błonę komórkową następuje wysycenie. Istnienie współzawodnictwa KT w ich wychwycie wskazuje wprawdzie, że może to być transport przez sarkolemmę, niemniej jednak nie można wykluczyć, że wysyceniu ulega któryś z procesów wewnątrzkomórkowego metabolizmu KT. Stąd też powstała konieczność zbadania układu, w którym nie zachodziłby wewnątrzkomórkowy metabolizm KT. Bonen i wsp. (1998b) wykorzystali do tego celu liposomy utworzone z błon komórkowych mięśni szkieletowych szczura składających się głównie z włókien tlenowych bądź tlenowo-glikolitycznych oraz składających się w przewodzie z włókien glikolitycznych. Autorzy ci potwierdzili, że transport kwasu palmitynowego również w takim układzie doświadczalnym wysycą się wraz ze wzrostem stężenia NKT. Wykazali oni ponadto, że maksymalny wychwyty KT w liposomach z mięśni o przewodzie włókien tlenowych bądź tlenowo-glikolitycznych był o 80% większy niż w liposomach z mięśni o przewodzie włókien glikolitycznych. Dowodzi to, że mięśnie o przewodzie włókien tlenowych i tlenowo-glikolitycznych intensywnie wykorzystujące KT, charakteryzują się nie tylko dużą zawartością enzymów tlenowych, ale również, że ich błony komórkowe mają większą zdolność do transportu KT niż błony komórkowe mięśni o przewodzie włókien glikolitycznych.

Z drugiej strony, ze względu na to, że błony fosfolipidowe nie stanowią bariery dla KT jak opisano w podrozdziale 2.2.1, część badaczy uważa, że wychwyty KT nie wymaga dodatkowej obecności białek transportujących (Zakim, 1996). Hamilton (1998) postuluje, że tendencja do wysycania procesu wychwytywania KT w zależności od stężenia NKT nie musi odzwierciedlać procesu oddziaływania białek transportujących z KT, lecz równowagę pomiędzy kwasami tłuszczowymi obecnymi w błonie komórkowej i występującymi w kompleksie z albuminą. Autor ten sugeruje, że obserwowane zmniejszanie się wychwyty KT po modyfikacji białek błonowych nie musi wynikać z

dezaktywacji tych białek, lecz być skutkiem zmiany integralności błony komórkowej wywołanej przez te modyfikacje. Hamilton (1998) nie wykluczając istotnej roli białek transportujących, uważa, że mogą one pomagać np. w zwiększaniu zdolności błony komórkowej do akumulacji KT, co w konsekwencji powodowałoby wzrost różnicy stężeń KT w błonie komórkowej i cytosolu i wspomagałoby bierną dyfuzję KT do wnętrza komórki. Inną potencjalną rolą białek transportujących mogłoby być kierowanie KT bezpośrednio do enzymów np. syntetazy acylokoenzymu-A (Schaffer i Lodish 1994; Gargiulo i wsp. 1999) katalizującej przemianę kwasów tłuszczowych w estry z koenzymem-A. Estryfikacja KT powoduje obniżenie stężenia KT w cytosolu i tym samym powoduje podtrzymywanie różnicy stężeń KT pomiędzy błoną komórkową, a cytosolem.

### **2.2.3. Białka wiążące kwasy tłuszczowe zlokalizowane w błonie komórkowej**

Obecnie, zainteresowanie wielu badaczy skupia się na zlokalizowanych w błonie komórkowej białkach o których sądzi się, że biorą aktywny udział w wychwycie KT. Należą do nich: błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABPpm - fatty acid binding protein plasma membrane) po raz pierwszy zidentyfikowane przez Stremmela i wsp. (1985), translokaza kwasów tłuszczowych (FAT - fatty acid translocase) opisana przez Abumrad i wsp. (1993) oraz białko transportujące kwasy tłuszczowe (FATP - fatty acid transport protein) opisane w 1994 roku przez Schaffer i Lodisha.

Poniżej przedstawiono krótką tylko charakterystykę w.w. białek. Dokładniejsze omówienie tego zagadnienia opublikowano niedawno w pracy przeglądowej Synak i Budohoski (2000).

#### **Błonowe białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABPpm)**

FABPpm (fatty acid binding protein plasma membrane), białko o masie cząsteczkowej 40 kDa po raz pierwszy wyizolowano z oczyszczonych błon komórkowych hepatocytów szczura (Stremmel i wsp., 1985). Obecność tego białka stwierdzono w jelicie szczura (Bonen i wsp., 1998a, Turcotte, 1998), a później w ścianach adipocytów i

komórek mięśnia sercowego oraz mięśni szkieletowych szczura (Turcotte i wsp., 1997) i człowieka (Calles-Escandon i wsp., 1996).

FABPpm jest białkiem peryferyjnym, zlokalizowanym na zewnętrznej stronie błony komórkowej (Sorrentino i wsp., 1991; Zhou i wsp., 1990, Zhou i wsp., 1995). Zawartość FABPpm w sarkolemie miocytów szczura zależy od intensywności metabolizmu KT zachodzącego w danym mięśniu (Bonen i wsp., 1998b, Turcotte i wsp., 1997). Za ważną rolę FABPpm w metabolizmie KT przemawia fakt, że zawartość tego białka w błonach komórkowych wzrasta w sytuacjach, w których zwiększa się wykorzystywanie kwasów tłuszczowych. Tak więc Kiens i wsp. (1997) stwierdzili, że u człowieka trening fizyczny zwiększa zawartość FABPpm w błonie komórkowej mięśni prostowników kolana w porównaniu do błony tychże mięśni nie poddanych treningowi. U szczurów poddanych głodzeniu przez 48 godzin stwierdzono natomiast zwiększenie o 60% zawartości FABPpm w mięśniach o przewadze włókien tlenowych o tlenowo-glikolitycznych, przy czym zawartość tego białka w mięśniach o przewadze włókien glikolitycznych nie ulegała zmianom (Turcotte i wsp., 1997). Z kolei zablokowanie FABPpm przy użyciu przeciwciał prowadzi do zmniejszenia wychwytu KT (Stremmel i Diede, 1989, Stremmel i Theilmann, 1986, Goresky i wsp., 1994, Bonen i wsp., 1998a). Należy podkreślić, że blokowanie FABPpm nie powoduje kompletnego zahamowania wychwytu KT, co wskazuje, że inne białka transportujące lub inne mechanizmy mogą również determinować ten proces.

### **Translokaza kwasów tłuszczowych (FAT)**

Pierwszym doniesieniem sugerującym udział w wychwyte KT białka o masie około 85 kDa była praca Abumrad i wsp. (1984). Białko to, nazwane translokazą kwasów tłuszczowych (FAT -fatty acid translocase), jest białkiem integralnym, zawiera 10 reszt glikozylowych, a jego punkt izoelektryczny wynosi 6,9. FAT wykazuje dużą homologię (85%) z białkiem CD36 człowieka (Harmon i Abumrad, 1993; Abumrad i wsp., 1993). Stwierdzono także, że wychwyty KT potencjalnie determinowany przez FAT nie zależy od

obecności ATP, oraz że zablokowanie FAT nie wpływa na wychwyt przez adipocyty krótkołańcuchowych KT (Abumrad i wsp., 1984).

Obecność FAT potwierdzono w komórkach mięśnia sercowego, jelit, mięśni szkieletowych i dojrzałych komórkach tkanki tłuszczowej szczura (Harmon i Abumrad, 1993). Nie stwierdzono natomiast jego obecności w preadipocytach nie metabolizujących KT. Coraz liczniejsze są również dowody na to, że FAT odgrywa istotną rolę w wychwycie KT przez mięśnie szkieletowe. Badając zawartość mRNA FAT w mięśniach szkieletowych szczura o różnym składzie włókien Bonen i wsp. (1998b) stwierdzili, że była ona kilkakrotnie większa w mięśniu płaszczkowatym, składającym się głównie z włókien tlenowych, niż w zginaczu krótkim palców, mięśniu o przewadze włókien glikolitycznych. Wykazano ponadto, że u szczura zawartość FAT w liposomach z serca, mięśni o przewadze włókien tlenowych bądź tlenowo-glikolitycznych oraz mięśni o przewadze włókien glikolitycznych koreluje z wielkością wychwytu KT przez te tkanki oraz z zawartością FABPm (Luiken i wsp., 1999b).

Ważnych informacji dostarczyła także praca Bonena i wsp. (1999). Autorzy ci poddali mięśnie szkieletowe szczura chronicznej (24h / dobę) 7-dniowej stymulacji elektrycznej i stwierdzili, że wychwyt KT przez liposomy uzyskane z mięśni stymulowanych był dwukrotnie większy niż przez liposomy z mięśni nie stymulowanych, przy czym wzrostowi wychwytu towarzyszył 3,4-krotny wzrost zawartości FAT. Istnieją więc silne przesłanki aby przypuszczać, że FAT bierze bezpośredni udział w wychwycie KT.

### **Białko transportujące kwasy tłuszczowe (FATP)**

Znacznie mniej jest danych w dostępnym piśmiennictwie na temat roli białka transportującego kwasy tłuszczowe (FATP - fatty acid transport protein) sklonowanego przez Schaffer i Lodisha (1994). Białko to jest integralnym składnikiem błony komórkowej, a jego masa cząsteczkowa wynosi 63 kDa (Schaffer i Lodish, 1994).

Działanie FATP jest najprawdopodobniej zależne od obecności ATP (Stuhlsatz-Krouper i wsp., 1998).

Obecność FATP potwierdzono w tkankach charakteryzujących się intensywnym metabolizmem KT, takich jak serce, mięśnie szkieletowe czy tkanka tłuszczowa (Schaffer i Lodish, 1994). Zawartość mRNA FATP jest kilkakrotnie większa w mięśniach tlenowych w porównaniu do mięśni glikolitycznych (Bonnen i wsp., 1998b, Van Nieuwenhoven i wsp., 1999).

Hui i wsp. (1998) wykazali, że w izolowanych adipocytach myszy insulina dziesięciokrotnie obniża transkrypcję FATP, natomiast głodzenie przez 48 godzin powoduje jedenastokrotny wzrost zawartości mRNA FATP. Pozwala to przypuszczać, że w tkance tłuszczowej FATP może wspomagać uwalnianie KT. O ile jednak udział FATP w wychwycie KT przez tkankę tłuszczową nie wydaje się budzić wątpliwości (Berk i wsp., 1997), o tyle rola jaką pełni to białko w mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych nie jest jeszcze w pełni udokumentowana (Luiken i wsp., 1999b).

### **Współdziałanie białek transportujących**

Mechanizm działania opisanych wyżej białek transportujących nie jest jak dotąd dokładnie poznany (Glatz i wsp., 1997). Nie ma np. zgodności co do tego czy białka te funkcjonują oddzielnie o czym świadczą badania z zablokowaniem FABPpm (Stremmel i Theilmann, 1986; Stremmel i wsp., 1986; Van Nieuwenhoven i wsp., 1995) lub FAT (Harmon i wsp., 1991) powodującym tylko częściowe zahamowanie wychwytu KT, czy też w sposób skoordynowany (Glatz i Van der Vusse, 1996). Za tą drugą możliwością przemawiałyby np. koekspresja w kardiomiocytach FAT i cytoplazmatycznego FABP (heart fatty acid binding protein - H-FABP) (Van Nieuwenhoven i wsp., 1995), a także koekspresja FABPpm, FAT, FATP, cytoplazmatycznego FABP w mięśniu sercowym i w mięśniach szkieletowych szczura (Van Nieuwenhoven i wsp., 1999) oraz brak zwiększonego wychwytu KT, gdy obecne jest tylko FAT (Van Nieuwenhoven i wsp., 1998). W tym drugim przypadku FABPpm,

będące białkiem peryferyjnym, mogłoby pełnić funkcję czynnika wychwytyjącego KT, natomiast FAT oraz FATP, będące integralnymi białkami błonowymi, mogłyby brać udział w transporcie KT poprzez błonę komórkową (Glatz i Van der Vusse, 1996).

Wydaje się, że FAT i FATP nie współdziałają ze sobą, natomiast istnieją przesłanki pozwalające sądzić, że białka te kierują KT do różnych szlaków metabolicznych. Memon i wsp. (1998) zbadali zmiany w zawartości mRNA FAT i mRNA FATP w różnych tkankach chomika syryjskiego w posocznicy. W warunkach tych  $\beta$ -oksydacja jest hamowana w wielu tkankach, m.in. w wątrobie, sercu i w mięśniach szkieletowych, natomiast synteza KT oraz synteza triacylogliceroli nasila się w wątrobie (Memon i wsp., 1998). Stwierdzono, że w posocznicy we wszystkich badanych tkankach oprócz wątroby zmniejsza się ilość mRNA FAT oraz mRNA FATP, w wątrobie zaś ilość mRNA FAT wzrosła 4-5-krotnie, natomiast zawartość mRNA FATP zmniejszyła się o 70-80%. Może to sugerować, że FATP kieruje KT do mitochondriów i dalej na szlak  $\beta$ -oksydacji, a FAT kieruje KT na szlak syntezy triacylogliceroli (TG). Hipotezę tę wspiera dodatkowo obserwacja, że w warunkach głodzenia wzrasta zawartość mRNA FATP natomiast obniża się zawartość mRNA FAT (Memon i wsp., 1998). W tej sytuacji, odwrotnie niż w przypadku posocznicy, następuje wzmożenie procesu  $\beta$ -oksydacji z jednoczesnym zmniejszeniem syntezy TG.

#### **2.2.4. Współistnienie dyfuzji biernej i dyfuzji ułatwionej w procesie wychwytu KT przez komórki**

Wydaje się prawdopodobne, że w warunkach fizjologicznych w wychwycie KT uczestniczą jednocześnie dwa mechanizmy: bierna dyfuzja KT do wnętrza komórki oraz tzw. "dyfuzja ułatwiona" wspomagana przez białka transportujące (Glatz i wsp., 1997). Mimo intensywnych badań, prowadzonych w ostatnich latach, nie ma jednak pełnej zgodności, który z tych mechanizmów dominuje w określonej sytuacji. Schaffer i Lodish (1994) postulują, że w warunkach podstawowych KT wychwytywane są przez komórki za pośrednictwem biernej dyfuzji, natomiast w razie zwiększonego zapotrzebowania na KT,

białka transportujące zwiększają ich wychwyty. Z kolei Abumrad i wsp. (1981) uważają, że białka transportujące wspomagają wychwyty przy niskich stężeniach KT w osoczu, natomiast wraz ze wzrostem stężenia KT mechanizmem dominującym staje się bierna dyfuzja. Ten ostatni pogląd zdobywa obecnie coraz więcej zwolenników. Stump i wsp. (1992) stosując analizę komputerową danych dotyczących wychwyty znakowanego trytem kwasu oleinowego przez izolowane hepatocyty wykazali, że zależność wychwyty od stężenia niezwiązanego z albuminą kwasu oleinowego najlepiej opisuje krzywa będąca sumą dwóch komponentów: mechanizmu wysycalnego (z udziałem transporterów białkowych) oraz niewysycalnego (bierna dyfuzja). Przy fizjologicznych stosunkach stężenia kwasu oleinowego do stężenia albuminy ( $V$ ) poniżej 3 ponad 90% wychwyty zachodzi za pośrednictwem mechanizmu wysycalnego, natomiast gdy stosunek ten przekroczy wartość 3, udział mechanizmu niewysycalnego zaczyna dominować osiągając wartość 87% dla  $V = 6,7$ . Podobnie Luiken i wsp. (1999a) na podstawie stwierdzenia, że wychwyty KT jest hamowany maksymalnie w 80% w obecności czynników denaturujących białka błonowe (np. floretina czy trypsyna) (Luiken i wsp., 1997; Luiken i wsp., 1999b) uważają, że w warunkach fizjologicznych około 80% wychwyty zachodzi z udziałem białek transportujących KT natomiast około 20% przez bierną dyfuzję.

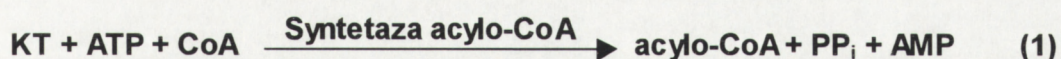
Niewiele także wiadomo na temat czynników decydujących o tym, czy dana cząsteczka KT przenika do komórki za pośrednictwem biernej dyfuzji czy dyfuzji ułatwionej. Można przypuszczać, że zależy to od tego czy cząsteczka ta jest w postaci niezdysocjowanej (sprotonowanej), czy też zdysocjowanej. Interesujących wyników na ten temat dostarczyła praca Schmidera i wsp. (1996), którzy badali wychwyty kwasu  $\alpha_2, \beta_2, \omega_3$ -heptafluorostearynowego (HFS) przez hepatocyty. Analog ten jest znacznie silniejszym kwasem niż kwas stearynowy i w fizjologicznych zakresach pH jest niemal całkowicie zdysocjowany. Okazuje się, że wychwyty HFS przez hepatocyty przy stosunkach stężeń KT do albuminy większych niż 3, a więc w warunkach, w których dominuje mechanizm wysycalny ma identyczną kinetykę jak wychwyty kwasu



stearynowego. Co więcej, zablokowanie białek błonowych przez 11,11-azistearynian powodowało zablokowanie wychwyty zarówno kwasu stearynowego jak i HFS. Wyniki te mogą świadczyć, że wychwyt cząsteczek KT w postaci zdysocjowanej odbywa się dzięki mechanizmowi wysycalnemu i błonowym transporterom kwasów tłuszczowych. Niezdysocjowane cząsteczki KT, zgodnie z modelem zaproponowanym przez Hamiltona przedstawionym w rozdziale 2.2.1., mogą być natomiast wychwytywane za pośrednictwem biernej dyfuzji.

### 2.3 Wbudowywanie KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe.

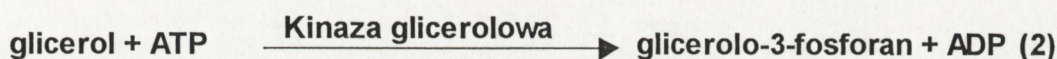
Wychwycone przez komórkę kwasy tłuszczowe wiązane są przez cytosolowe białka wiążące kwasy tłuszczowe FABPc (cytosolic fatty acid binding proteins) i w postaci takiego kompleksu docierają do organelli komórkowych gdzie są metabolizowane. Zanim KT ulegną dalszym przemianom metabolicznym są one „aktywowane”, to znaczy przekształcane przez syntetazę acylo-CoA przy udziale ATP w pochodną tioestrową z koenzymem A, acylo-CoA (Równanie 1).

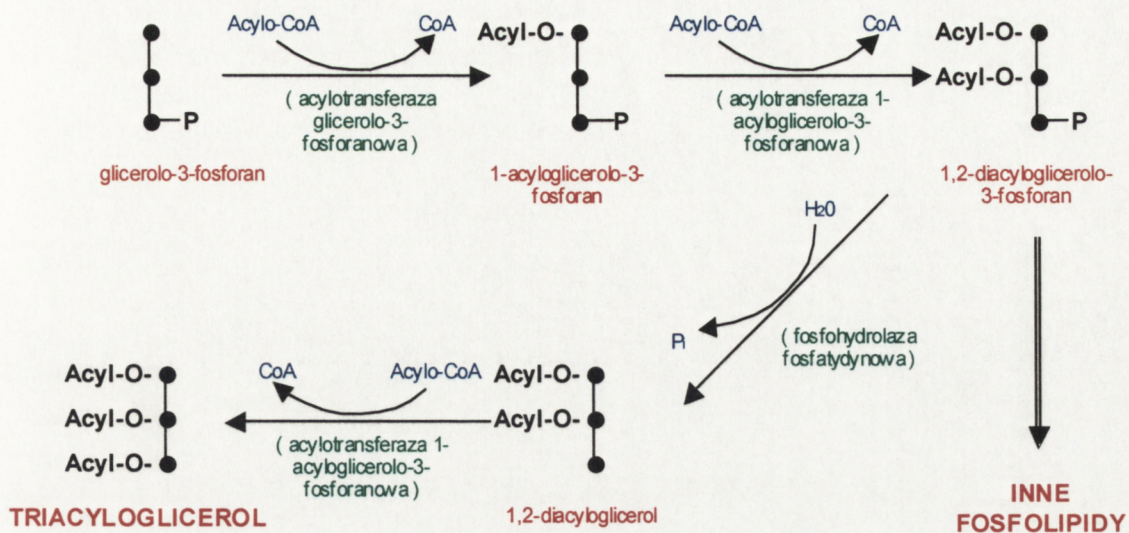


Acylo-CoA może być następnie wykorzystywany do produkcji energii w procesie  $\beta$ -oksydacji albo do syntezy triacylogliceroli lub fosfolipidów. Schemat syntezy triacylogliceroli (TG) przedstawiono na Ryc. 2 (według Murray i wsp., 1998). Acylo-CoA reaguje z glicerolo-3-fosforanem przy udziale acylotransferazy glicerolo-3-fosforanowej w wyniku czego powstaje 1-acyloglicerolo-3-fosforan (kwas lizofosfatydowy). Następnie, do 1-acyloglicerolo-3-fosforanu dołączana jest kolejna reszta acylowa z acylo-CoA, przy udziale acylotransferazy 1-acyloglicerolo-3-fosforanowej, tworząc 1,2-diacyloglicerolofosforan (kwas fosfatydowy). Kwas fosfatydowy może ulec dalszym reakcjom prowadzącym do powstania innych fosfolipidów lub zostać przekształcony przez fosfohydrolazę fosfatydynową w 1,2-diacyloglicerol (DG). Przyłączenie do 1,2-

diacyloglicerolu kolejnej reszty acylowej z acylo-CoA przy udziale acylotransferazy diacyloglicerolowej prowadzi do powstania triacyloglicerolu.

Katabolizm triacylogliceroli zachodzi odmiennie od szlaku ich biosyntezy. W tkance tłuszczowej triacyloglicerole hydrolyzowane są przez układ hormonozależnej lipazy (HSL Hormone Sensitive Lipase). Należą do niego polipeptyd o wielkości 84kDa wykazujący największą aktywność w stosunku do wiązań estrowych triacylogliceroli w pozycji 1 i 3 (Fredrikson i Belfrage, 1983) oraz lipaza hydrolyzująca monoacyloglicerole (MGSL), która nie jest kontrolowana przez układ hormonalny (Fredrikson i wsp., 1986). Istnieje również lipaza hydrolyzująca diacyloglicerole, ale z uwagi na właściwości wyżej wspomnianych dwóch lipaz jej aktywność nie jest niezbędna do kompletnej hydrolyzy triacylogliceroli (Yeaman, 1990). W mięśniach szkieletowych katabolizm triacylogliceroli również zachodzi przy udziale lipazy hormonozależnej (Langfort i wsp. 1999). Etapem regulatorowym w procesie całkowitej hydrolyzy triacylogliceroli jest proces uwalniania pierwszej cząsteczki KT (Langin i wsp. 1996) w wyniku czego z TG powstaje diacyloglicerol (DG). Hydrolyza kolejnego wiązania estrowego przez lipazę hormonowrażliwą prowadzi do uwolnienia kolejnej cząsteczki KT i powstania monoacyloglicerolu (MG). MG z kolei poddany działaniu MGSL hydrolyzowany jest do glicerolu i cząsteczki KT. Kwasy tłuszczowe powstałe w wyniku hydrolyzy TG mogą być ponownie przekształcone w acylo-CoA i brać udział w procesie biosyntezy triacylogliceroli. Glicerol natomiast aby wejść w szlak biosyntezy TG musi zostać przekształcony, przez kinazę glicerolową z udziałem cząsteczki ATP, w glicerolo-3-fosforan (Równanie 2). Do niedawna powszechnie uważano, że proces ten zachodzi głównie w wątrobie i nerkach (Murray i wsp., 1998), natomiast udział mięśni szkieletowych w tym procesie jest znikomy (Robinson i Newsholme, 1967). Ostatnio pojawiły się jednak doniesienia (Guo i Jensen, 1999, Watford, 2000), że synteza glicerolo-3-fosforanu zachodzi również w znaczącym stopniu w mięśniach szkieletowych.





Ryc. 2

Schemat biosyntezy triacylogliceroli (według Murray i wsp., 1998).

CoA – Koenzym A

Acylo-CoA – Acylokoenzym A

P – Reszta fosforanowa

## **2.4. Wybrane czynniki wpływające na metabolizm KT w mięśniach szkieletowych**

### **2.4.1. Wpływ ekspozycji na niską temperaturę otoczenia**

Jednym z czynników wpływających na zwiększenie tempa metabolizmu KT w mięśniach szkieletowych jest ekspozycja na niską temperaturę otoczenia (Bell i Thompson, 1979, Florez-Duquet i McDonald, 1998). Pod wpływem zimna w organizmie stałocielnym następuje skurcz naczyń krwionośnych skóry zmniejszający utratę ciepła i uruchamiane są procesy termogenezy mające na celu produkcję ciepła. Towarzyszy temu wzmożony przepływ krwi przez organy zaangażowane w procesy termogenezy co pozwala na zwiększenie do nich dostawy substratów energetycznych (patrz: Gordon, 1990). W mięśniach szkieletowych ciepło wytwarzane jest głównie na drodze termogenezy drzeniowej (patrz: Jansky, 1998). W dostępnym piśmiennictwie jest stosunkowo niewiele danych w jakiej temperaturze otoczenia rozpoczyna się proces drżenia u szczura, jednak, można szacować, że mieści się ona w zakresie 15-20°C (patrz Gordon, 1990). Adan i wsp. (1995) wyrażają pogląd, że termogeneza drzeniowa w mięśniach szkieletowych szczura ma na celu zapewnienie ciepła zanim zostaną uaktywnione inne mechanizmy termoregulacji takie jak termogeneza bezdrzeniowa w brunatnej tkance tłuszczowej.

Podczas ekspozycji na niską temperaturę otoczenia ważnym substratem energetycznym dla mięśni szkieletowych jest glikogen mięśniowy i glukoza pochodząca z rozpadu glikogenu wątrobowego (Górski i wsp., 1981, Martineau i Jacobs, 1988). W warunkach tych zwiększa się wychwytywanie i utlenianie glukozy przez mięśnie szkieletowe pomimo obniżonego poziomu insuliny we krwi (Shibata i wsp., 1989, Vallerand i wsp., 1983, Vallerand i wsp., 1990). W niskiej temperaturze otoczenia podwyższa się stężenie mleczanu we krwi (Larkin i wsp., 1992), natomiast poziom glukozy utrzymuje się na stałym poziomie (Adan i wsp., 1995, Larkin i wsp., 1992, Shibata i wsp., 1989). Podczas krótkotrwałej ekspozycji szczurów na zimno (4 godz.) zawartość glikogenu wątrobowego nie obniża się istotnie (Larkin i wsp., 1992).

W wyniku ekspozycji na zimno w organizmie zachodzi szereg zmian hormonalnych, między innymi obniża się sekrecja insuliny (Smith, 1984, Vallerand i wsp., 1983), podwyższa stężenie adrenaliny i noradrenaliny we krwi (Avakian i Horvath, 1981). W konsekwencji kilkakrotnie wzrasta lipoliza w tkance tłuszczowej (Cimmino i wsp., 1997, Vallerand i wsp., 1999) natomiast lipogeneza ulega zahamowaniu (Vallerand i wsp., 1999). Co za tym idzie, wzrasta stężenie KT we krwi co potwierdzono u wielu gatunków ssaków (Vallerand i Jacobs, 1989, Bell i Thompson, 1979, Minaire i wsp., 1973) w tym u szczura (Cimmino i wsp., 1997, Smith i Davidson, 1982). Podczas ekspozycji na zimno udział triacylogliceroli osocza w dostarczaniu KT do mięśni szkieletowych jest również znaczący (Mantha i Deshaies, 1998). Nie jest jednak jasne czy ekspozycja na zimno wpływa na wytwarzanie w mięśniach szkieletowych białek wspomagających wychwyt KT. Wydaje się także, że we wczesnym okresie ekspozycji na zimno triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe są ważnym źródłem KT dla mięśni szkieletowych (Górski i wsp., 1981) i serca (Miller i Oscai, 1984). W warunkach tych, przy użyciu znakowanych izotopami kwasów tłuszczowych stwierdzono wzrost wychwytu i utleniania KT przez mięśnie szkieletowe (Bell i Thompson, 1979). Vallerand i wsp. (1999) szacują, że u człowieka podczas ekspozycji na zimno 48% energii zużytej w procesach termogenezy pochodzi z utleniania KT. W piśmiennictwie brak jest natomiast odpowiedzi na pytanie czy wskutek ekspozycji na zimno zmienia się wbudowywanie kwasów tłuszczowych w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe.

#### **2.4.2. Wpływ krótkotrwałego głodzenia**

Przy braku pożywienia tempo metabolizmu ulega obniżeniu (patrz: Benthem i wsp., 1995), a organizm uruchamia zgromadzone zasoby substratów energetycznych aby utrzymać tempo przemiany materii na poziomie koniecznym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

Ze względu na to, że w czasie krótkotrwałego głodzenia glukoza musi być oszczędzana na potrzeby mózgu podstawowym substratem energetycznym dla mięśni

szkieletowych stają się KT (Bentham i wsp., 1995, Goodman i Ruderman, 1980, Webber i Macdonald, 1994). Największe rezerwy KT zgromadzone są w tkance tłuszczowej w postaci triacylogliceroli. W czasie głodu obniża się stężenie insuliny we krwi (Klein i wsp., 1993, Vallerand i wsp., 1983) i w tkance tłuszczowej wzrasta aktywność hormonowrażliwej lipazy w wyniku czego zwiększa się lipoliza (Samra i wsp., 1996). Niskie stężenie insuliny powoduje także zahamowanie syntezy triacylogliceroli w tkance tłuszczowej (Samra i wsp., 1996, Bentham i wsp., 1995). W efekcie tych zmian z tkanki tłuszczowej zostają uwolnione KT, a we krwi podwyższa się ich stężenie. Aktywność hormonowrażliwej lipazy zwiększa się również w sercu (Miller i Oscai, 1984). Podczas głodu szczur zużywa także KT pochodzące z triacylogliceroli wewnątrzmięśniowych co stwierdzono w sercu (Miller i Oscai, 1984), przeponie (Abumrad i wsp. 1978) i mięśniach szkieletowych (Jaromowska i Górski, 1985). Ponadto, KT uwolnione z triacylogliceroli znajdujących się w kropelkach tłuszczu zlokalizowanych pomiędzy włóknami mięśniowymi mogą być ważnym źródłem KT dla mięśni szkieletowych w okresie głodu (Glatz i Veerkamp, 1982).

Mięśnie szkieletowe szczura adaptują się do warunków, w których zwiększa się wykorzystanie przez nie kwasów tłuszczowych czego przejawem jest nasilona ekspresja FABPpm, białka o którym sądzi się, że czynnie wspomaga wychwyt KT przez komórki (Turcotte i wsp., 1997). Podobnie, w mięśniu sercowym szczura stwierdzono wzrost ilości mRNA translokazy kwasów tłuszczowych (FAT) po 46 godzinach pozbawienia pożywienia (Van der Lee i wsp. 2001). Podczas głodzenia w mięśniach szkieletowych zwiększa się utlenianie KT (Winder i wsp., 1995). Sprzyja temu obniżenie zawartości wewnątrzkomórkowego malonylo-CoA (Merril i wsp. 1998, Winder i wsp., 1995), inhibitora acylotransferazy karnitynowej I (CPT-I), enzymu przy udziale którego z acylo-CoA powstaje acylo-karnityna transportująca KT do matriks mitochondrialnego gdzie ulegają  $\beta$ -oksydacji (Eaton i wsp., 1996). Rozpad wewnątrzkomórkowego malonylo-CoA katalizowany jest przez dekarboksylazę malonylo-CoA, której aktywność w mięśniach szkieletowych wzrasta podczas głodu (Young i wsp., 2001). Z kolei synteza malonylo-

CoA zachodzi przy udziale karboksylazy acylo-CoA (Winder i wsp., 1995). Merrill i wsp. (1998) stosując technikę perfundowanej kończyny tylnej szczura stwierdzili, że zahamowanie aktywności karboksylazy acylo-CoA w mięśniach szkieletowych szczura powoduje obniżenie w nich poziomu malonylo-CoA i wzrost utleniania KT. W warunkach głodzenia Winder i wsp. (1995) nie stwierdzili jednak obniżonej aktywności karboksylazy acylo-CoA w mięśniach szkieletowych. Po podaniu pożywienia szczurom uprzednio głodzonym przez 48 godz. we krwi obniża się stężenie KT, a tempo utleniania KT gwałtownie maleje (Chien i wsp. 2000). W warunkach tych, w mięśniach szkieletowych stwierdzono wzrost stężenia malonylo-CoA i obniżenie poziomu acylo-karnityny, nie stwierdzono natomiast znaczącego wzrostu aktywności karboksylazy acylo-CoA (Chien i wsp., 2000). Sugeruje to, że, przynajmniej u szczurów, karboksylaza acylo-CoA nie bierze bezpośredniego udziału w regulacji zawartości malonylo-CoA w mięśniach szkieletowych.

Wspomniane wyżej obniżenie stężenia insuliny we krwi w czasie krótkotrwałego głodzenia prowadzi do zahamowania wychwytu i utylizacji glukozy przez tkanki obwodowe. Zmniejszone utlenianie glukozy jest także wynikiem działania hormonu wzrostu (Moller i wsp., 1990). Wychwyt glukozy przez mięśnie szkieletowe i serce szczura może obniżyć się aż o 60-90%, przy czym ekspozycja na niską temperaturę otoczenia powoduje odwrócenie tego procesu (Shibata i wsp., 1989). U szczura, podczas krótkotrwałego głodzenia (48 godz.) w znacznym stopniu zużyte zostają zasoby glikogenu wątrobowego (Koubi i wsp., 1991, Benthem i wsp., 1995), a we krwi obniża się poziom glukozy (Goodman i wsp., 1980, Shibata i wsp., 1989, Vallerand i wsp. 1983). W warunkach tych stężenie adrenaliny we krwi szczurów praktycznie nie zmienia się (Benthem i wsp., 1995), nie zwiększa się także wydzielanie glukagonu (Goodman i wsp., 1980), który stymuluje glukoneogenezę w wątrobie. Głodzenie prowadzi do obniżenia poziomu mleczanu i pirogronianu we krwi oraz do podwyższenia stężenia ketokwasów wytwarzanych w wątrobie z KT, które stają się ważnym substratem energetycznym (Goodman i wsp., 1980).

Stężenie tyroksyny i trijodotyroniny we krwi szczura ulega obniżeniu w czasie 48 godzinnego głodzenia czemu towarzyszy obniżenie tempa spoczynkowej przemiany materii i katabolizmu białek (Goodman i wsp., 1980, Goodman i Ruderman, 1980). Nasileniu katabolizmu białek mięśniowych zapobiega także hormon wzrostu (Norrelund i wsp., 2001), którego stężenie we krwi u szczura podwyższa się podczas głodzenia przez 48 godz. (Hartman i wsp., 1992).

Reasumując, krótkotrwałe głodzenie (48 godz.) powoduje obniżenie tempa przemiany materii i zwiększa wykorzystanie KT, a obniża wykorzystanie glukozy jako substratów energetycznych przez mięśnie szkieletowe. Prawdopodobnie powoduje ono zmiany adaptacyjne w miocytach zwiększające ich zdolność do wychwytywania KT (Turcotte i wsp., 1997). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono jednak odpowiedzi na pytanie czy głodzenie modyfikuje również wbudowywanie KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe.



### 3. Założenia i cele pracy

Jak omówiono we Wstępie kwasy tłuszczowe są ważnym źródłem energii dla mięśni szkieletowych. Są one transportowane we krwi przez albuminę, przy czym KT znajdujące się w kompleksie z albuminą pozostają w równowadze z niewielką frakcją KT nie związanych z albuminą (NKT). Ze względu na to, że kompleks albumina-KT w zasadzie nie jest zdolny do przenikania przez błony komórkowe cząsteczka KT aby wniknąć do wnętrza komórki musi najpierw oddysocjować z kompleksu. Sugeruje to, że wychwyty powinien zależeć od wielkości puli NKT. Z drugiej strony, jak wynika z danych przedstawionych we Wstępie, w piśmiennictwie istnieją również doniesienia w których stwierdzono, że wychwyty KT nie zależą od wielkości puli NKT, natomiast jest funkcją wielkości puli KT związanych z albuminą czyli stężenia kompleksu albumina-KT. Nie jest więc dotychczas w pełni rozstrzygnięte czy wychwyty KT z osocza przez mięśnie szkieletowe i wbudowywanie ich w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe zależy od całkowitego stężenia KT, od wielkości puli NKT, czy też od obydwu tych frakcji.

W badaniach nad metabolizmem lipidów i „losami” KT można stosować zarówno techniki *in vivo*, *in vitro* jak i *in situ*. Do realizacji celów niniejszej pracy zastosowano technikę *in situ* perfuzji kończyn tylnych szczura. Pozwala ona, w porównaniu z techniką *in vitro* mięśnia inkubowanego, na dostarczanie kwasów tłuszczowych do mięśni bezpośrednio poprzez układ krwionośny zwierzęcia. Z drugiej zaś strony, w porównaniu z techniką *in vivo* infuzji, perfuzja kończyn tylnych umożliwia precyzyjną kontrolę ilości dostarczanych KT.

Obecnie uważa się, że wychwyty KT przez mięśnie szkieletowe jest przy najmniej po części wspomagany przez białka wiążące KT (FABPpm, FAT, FATP) zlokalizowane w błonach komórkowych miocytów. Ilość białek wiążących KT i tym samym zdolność komórek do wychwytywania KT może się zmieniać pod wpływem czynników modyfikujących metabolizm KT w mięśniach szkieletowych. Z doniesień w piśmiennictwie wiadomo, że u szczura krótkotrwałe głodzenie (48 godz.) powoduje wzrost ilości FABPpm w mięśniach szkieletowych o przewodzie włókien tlenowych. Nie wiadomo jednak czy powyższa

zmiana wpływa na wbudowywanie KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe oceniane techniką perfuzji kończyn tylnych szczura. Nie jest też jasne czy ekspozycja na niską temperaturę otoczenia, podczas której zwiększa się wykorzystanie KT przez mięśnie szkieletowe, może również modyfikować wbudowywanie KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe szczura. Stąd też postawiono następujące cele pracy:

1. Prześledzenie przebiegu wbudowywania kwasu palmitynowego w lipidy wewnątrzmięśniowe w różnym czasie trwania perfuzji.

2. Zbadanie zależności pomiędzy wbudowywaniem kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe, a całkowitym stężeniem tego substratu w medium perfuzyjnym.

3. Zbadanie zależności pomiędzy wbudowywaniem kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe, a stężeniem kwasu palmitynowego nie związanego z albuminą (NKP).

4. Zbadanie czy wbudowywanie KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe ulega modyfikacji u szczurów poddanych uprzednio wpływowi wybranych czynników wpływających stymulująco na wykorzystanie kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe tzn. 12 godzinnej ekspozycji na niską temperaturę otoczenia (6°C) oraz pozbawienia zwierząt karmy przez 48 godzin.

#### 4. Materiał i metody

##### Zwierzęta

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar (masa ciała 230 +/- 30g). Protokół badań został zatwierdzony przez Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.

Zwierzęta trzymane w klatkach w grupach po 10 sztuk w warunkach standardowych z zachowaniem 12 godzinnego cyklu dzień / noc. Szczury karmiono *ad libitum* standardową granulowaną karmą dla gryzoni produkowaną przez Zakład Wytwórci Pasz w Motyczy przy Centralnym Laboratorium Paszowym w Lublinie oraz podawano im wodę. Szczury eksponowane na niską temperaturę otoczenia trzymane w klatkach pojedynczo, aby zapobiec ewentualnemu wzajemnemu ogrzewaniu się zwierząt.

Na 12 godzin przed doświadczeniem, za wyjątkiem doświadczeń w których badano wpływ głodzenia przez 48 godzin na wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe, zwierzętom odbierano pokarm pozostawiając im swobodny dostęp do wody. Przed operacją poprzedzającą perfuzję szczury wprowadzane w stan głębokiej narkozy podając im dootrzewnowo pentobarbital sodowy w dawce 6mg / 100g masy ciała (preparat Vetbutal, Biowet, Puławy).

Wyodrębniono następujące grupy doświadczalne:

- Grupa I: grupa w której perfundowano medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 mM kwasu palmitynowego przez 30, 45 i 60 min.
- Grupa II: grupa w której perfundowano medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 mM, 1,5 mM lub 2,0 mM kwasu palmitynowego, czas perfuzji 30 min.
- Grupa III: grupa w której perfundowano medium zawierającym 4%, 6% lub 8% albuminy i odpowiednio 1,0 mM, 1,5 mM lub 2,0 mM kwasu palmitynowego, czas perfuzji 30 min.

- Grupa IV: grupa w której perfundowano kończyny tylne szczurów eksponowanych na zimno przez 12 godzin w komorze termicznej w temperaturze  $6 \pm 0,3$  °C, medium perfuzyjne zawierało 4% albuminy i 1,4 mM kwasu palmitynowego, czas perfuzji 30 min.
- Grupa V: grupa w której perfundowano kończyny tylne szczurów głodzonych przez 48 godzin, medium perfuzyjne zawierało 4% albuminy i 1,4 mM kwasu palmitynowego, czas perfuzji 30 min.

Pobierano następujące mięśnie:

- mięsień płaszczkowaty składający się głównie z włókien wolnokurczących tlenowych (typu I), (patrz: Dyck i wsp. 1997)
- czerwoną część mięśnia brzuchatego łydki składającą się głównie z włókien szybko kurczących tlenowo-glikolitycznych (typu IIA), (patrz: Dyck i wsp. 1997)
- czerwoną część mięśnia czworogłowego uda składającą się głównie z włókien szybko kurczących tlenowo-glikolitycznych (typu IIA) (patrz: Rasmussen i Winder 1997)
- mięsień podeszwowy łydki o mieszanym składzie włókien zawierający mniej więcej równe proporcje włókien szybko kurczących tlenowo-glikolitycznych (typu IIA) oraz włókien szybko kurczących glikolitycznych (typu IIB), (patrz: Armstrong i Phelps 1984)
- białą część mięśnia brzuchatego łydki składającą się głównie z włókien szybko kurczących glikolitycznych (typu IIB), (patrz: Dyck i wsp. 1997)
- białą część mięśnia czworogłowego uda składającą się głównie z włókien szybko kurczących glikolitycznych (typu IIB), (patrz: Rasmussen i Winder 1997)

#### **Protokół doświadczalny: procedura operacyjna, perfuzja kończyn tylnych**

Chirurgiczne przygotowanie szczurów i perfuzję kończyn tylnych przeprowadzano zgodnie z procedurą opisaną przez Górskiego i wsp. (1986). Zwierzęta poddawano

arteriotomii tętnicy szyjnej, do której następnie wprowadzano heparynizowaną kaniulę z solą fizjologiczną i przez którą pobierano krew w celu oznaczenia stężenia kwasów tłuszczowych. Następnie rozcinano powłokę brzuszną wzdłuż kresy białej, koagulowano widoczne naczynia krwionośne znajdujące się w powłoce brzusznej i usuwano po około 2 cm<sup>2</sup> powłoki brzusznej po każdej stronie nacięcia w celu ułatwienia dostępu do pola operacyjnego. W kolejnym etapie koagulowano jelito grube i cienkie u dołu podbrzusza, przewiązywano przetyk nicią na wysokości mostka i wnętrzości usuwano wraz z żołądkiem. Następnie usuwano przez koagulację jądra, nasieniowody, penis i pęcherz moczowy, po czym eksponowano aortę i żyłę główną w odcinku brzusznej. Widoczną tkankę tłuszczową usuwano, natomiast boczne odgałęzienia aorty i żyły głównej koagulowano. Następnie, rozdzielano żyłę główną i aortę poniżej rozgałęzienia żyły wątrobowej na długości około 1 cm, po czym przez tętnicę szyjną podawano 2000 jednostek heparyny (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa). Po upływie 30 s podwiązywano aortę i żyłę główną powyżej rozdzielenia i do aorty wprowadzano kaniulę teflonową 14G (Johnson-Johnson, USA) przy jednoczesnej powolnej infuzji medium pre-perfuzyjnego. Następnie do żyły głównej wprowadzano kaniulę teflonową 16G (Johnson-Johnson, USA), w wybranych doświadczeniach pobierano wątrobę, podwiązywano u nasady ogon i łapy celem zablokowania w nich krążenia, a zwierzę zabijano poprzez podanie śmiertelnej dawki pentobarbitalu sodowego poprzez kaniulę umieszczoną w tętnicy szyjnej.

Zwierzę przenoszono do termostatowanej komory o temperaturze 37°C i pre-perfundowano przez 30 minut. Tempo perfuzji zwiększano skokowo, aż do osiągnięcia przepływu około 50 ml / min w ciągu pierwszych 10 minut, po czym tempo perfuzji obniżano do 25 ml / min i zamykano obieg medium pre-perfuzyjnego. Po zakończeniu pre-perfuzji medium pre-perfuzyjne wymieniano na medium perfuzyjne, którego obieg również zamykano po 10 minutach perfuzji. Skład medium użytego do pre-perfuzji oraz perfuzji opisano w dalszej części pracy. Perfuzja była prowadzona zawsze przez 30 minut za wyjątkiem doświadczeń, w których badano wpływ czasu perfuzji (30, 45 i 60

minut) na wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe. W trakcie doświadczeń zarówno medium pre-perfuzyjne jak i perfuzyjne były stale nasycone karbogenem (mieszaniną tlenu i dwutlenku węgla, 95% : 5%). Ciśnienie parcjalne tlenu w medium perfuzyjnym monitorowano przy pomocy analizatora biochemicznego HemoGas 301 (High Tech Lab, Warszawa).

Po zakończeniu perfuzji z obu kończyn pobierano mięśnie. Po oczyszczeniu z widocznych fragmentów tkanki łącznej i tłuszczowej mięśnie zamrażano techniką freeze-clamp polegającą na błyskawicznym zamrażaniu w szczypcach trzymanyh w ciekłym azocie i przechowywano w zamrażarce w -70°C do dalszych analiz.

### **System Perfuzyjny**

System perfuzyjny składa się z następujących elementów:

-Dwukomorowej szafy z pleksiglasu wykonanej w naszym Zakładzie, której górna komora jest zamykana oraz ogrzewana za pomocą taśmy grzejnej podłączonej do termostatu z czujnikiem temperatury (LRT1, Dom Handlowy Nauki, Polska).

-Mieszadła magnetycznego z podgrzewaczem do mieszania medium perfuzyjnego, model PC 320 (Corning, USA) umieszczonego w komorze dolnej szafy.

-Pompy perystaltycznej Rabbit-Plus (Rainin Instruments Co. Inc., USA) umieszczonej w komorze dolnej szafy.

-Filtru FP-D50 (Dassel, Niemcy) umieszczonego na statywie w górnej komorze szafy do filtrowania medium perfuzyjnego przez sącdek z bibuły.

-„Płuc” umieszczonych w komorze górnej z układem eliminacji pęcherzyków gazu z medium perfuzyjnego (szklanego, zakręcanego pojemnika z około 20 m rurki umożliwiającej gazowanie medium perfuzyjnego, dar prof. Ronalda Terjunga, USA) do których doprowadzono karbogen (mieszanina O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>, 95 : 5, Multax, Polska).

-Przetwornika ciśnieniowego P230b (Gould Statham, USA) umieszczonego w komorze górnej na statywie na wysokości 3 cm od podstawy komory połączonego

poprzez wzmacniacz ETH-200 (CB Sciences Inc., USA) do komputera Power Macintosh 6000/60 z przetwornikiem analogowo-cyfrowym MacLab/2e (ADInstruments, Australia).

Medium perfuzyjne mieszane w dolnej komorze pompowane jest przez pompę perystaltyczną do filtra w komorze górnej, skąd następnie przechodzi do „Płuc” gdzie jest nasycane karbogenem, podgrzewane do temperatury 37°C, po czym doprowadzane do przetwornika ciśnieniowego, a następnie do tętnicy głównej szczura.

### **Medium pre-perfuzyjne i perfuzyjne**

Do doświadczeń używano medium perfuzyjne oparte na buforze Krebsa-Henseleita zawierające albuminę wołową, 4-8% w zależności od serii doświadczalnej, (Sigma, USA, art. A3912), kwas palmitynowy w stężeniu 1,0-2,0 mM (BDH, Dorset, Wielka Brytania) w zależności od serii doświadczalnej, [9,10-(n)-<sup>3</sup>H] kwas palmitynowy (Amersham Life Sciences, Wielka Brytania, Art. TRK 760), glukozę 5 mmol/dm<sup>3</sup> (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice), insulinę 100 mU/dm<sup>3</sup> (Polfa Tarchomin S.A., Warszawa) oraz aminokwasy typowe dla krwi szczura (Sigma, USA). Dokładny skład medium perfuzyjnego przedstawiono w Tabeli 1. Medium używane do pre-perfuzji było identyczne z medium perfuzyjnym, nie zawierało jedynie znakowanego trytem kwasu palmitynowego. Wszystkie używane odczynniki, jeżeli nie podano inaczej w tekście, były klasy czyste do analiz.

Kwas palmitynowy przygotowywano opierając się na zmodyfikowanej procedurze opisanej przez Borgstroma i Olivecrona (1961). Kwas palmitynowy przeprowadzano w sól sodową w sposób następujący: 5 mmol kwasu palmitynowego (1,2822 g) rozpuszczano w 30 ml gorącego alkoholu etylowego, po czym do roztworu dodawano 5,5 ml 1N wodorotlenku sodu (10% nadmiar). Alkohol odparowywano w strumieniu azotu, aż do zaniku zapachu alkoholu. Następnie palmitynian sodu zawieszano w niewielkiej ilości (około 30 ml) 0,9% roztworu chlorku sodowego, sonifikowano aż do uzyskania jednorodnej emulsji i rozpuszczano intensywnie mieszając w temperaturze 50°C w 500ml 16% roztworu albuminy wołowej w 0,9% roztworze chlorku sodowego.

Tabela 1

## Skład medium perfuzyjnego

L.p.	Składnik	Stężenie
1.	Albumina wołowa	4% – 8 % (w zależności od doświadczenia)
2.	Kwas palmitynowy	1,0-2,0 mmol / dm <sup>3</sup> (w zależności od doświadczenia)
3.	Kwas <sup>3</sup> H-palmitynowy	około 100 µCi / dm <sup>3</sup>
4.	Glukoza	5 mmol / dm <sup>3</sup>
5.	Insulina	100 mU / dm <sup>3</sup>
6.	Chlorek potasu	4,7 mmol / dm <sup>3</sup>
7.	Chlorek sodu	119 mmol / dm <sup>3</sup>
8.	Chlorek wapnia	2,5 mmol / dm <sup>3</sup>
9.	Fosforan potasowy I zasadowy	1,2 mmol / dm <sup>3</sup>
10.	Siarczan magnezu	1,2 mmol / dm <sup>3</sup>
11.	Wodorowęglan sodowy	25 mmol / dm <sup>3</sup>
12.	1-Aminomaślan	15 µmol / dm <sup>3</sup>
13.	Alanina	450 µmol / dm <sup>3</sup>
14.	Arginina	200 µmol / dm <sup>3</sup>
15.	Asparagina	70 µmol / dm <sup>3</sup>
16.	Cysteina	70 µmol / dm <sup>3</sup>
17.	Cytrulina	80 µmol / dm <sup>3</sup>
18.	Fenylalanina	80 µmol / dm <sup>3</sup>
19.	Glicyna	400 µmol / dm <sup>3</sup>
20.	Glutamina	350 µmol / dm <sup>3</sup>
21.	Histydyna	80 µmol / dm <sup>3</sup>
22.	Izoleucyna	100 µmol / dm <sup>3</sup>
23.	Kwas asparaginowy	35 µmol / dm <sup>3</sup>
24.	Kwas glutaminowy	200 µmol / dm <sup>3</sup>
25.	Leucyna	170 µmol / dm <sup>3</sup>
26.	Lizyna	400 µmol / dm <sup>3</sup>
27.	Metionina	70 µmol / dm <sup>3</sup>
28.	Ornityna	90 µmol / dm <sup>3</sup>
29.	Prolina	180 µmol / dm <sup>3</sup>
30.	Seryna	280 µmol / dm <sup>3</sup>
31.	Tauryna	200 µmol / dm <sup>3</sup>
32.	Treonina	300 µmol / dm <sup>3</sup>
33.	Tryptofan	70 µmol / dm <sup>3</sup>
34.	Tyrozyna	70 µmol / dm <sup>3</sup>
35.	Walina	200 µmol / dm <sup>3</sup>



Następnie roztwór filtrowano na gorąco i oznaczano stężenie kwasów tłuszczowych przy użyciu testu (Boehringer Mannheim, Niemcy, Free Fatty Acids – Half Micro Test, Art. 1383 175). Stosując identyczną procedurę przygotowywano sól sodową [9,10-(n)-<sup>3</sup>H] kwasu palmitynowego z dostępnego komercyjnie roztworu [9,10-(n)-<sup>3</sup>H] kwasu palmitynowego w toluenie (Amersham Life Sciences, Wielka Brytania, Art. TRK 760).

Medium przygotowywano zawsze w dniu doświadczenia. Bufor Krebsa-Hensleita wraz z glukozą i aminokwasami, gazowano karbogenem (mieszaniną tlenu i dwutlenku węgla, 95% : 5%) przez około 20 minut. Następnie, dodawano uprzednio przygotowane i przechowywane w zamrażarce (-20°C) 16% roztwór albuminy w 0,9% chlorku sodowego oraz roztwór zawierający około 10mM palmitynianu sodu w 16% albuminie w 0,9% chlorku sodowego, w stosownych ilościach tak aby uzyskać żądane stężenie końcowe kwasów tłuszczowych i albuminy. Przy pomocy 1N wodorotlenku sodu ustalano pH na 7,4, po czym dodawano insulinę, całość mieszano i filtrowano przez filtr 0,22 mikrona (Corning, USA, Art. 25952-1L). Odmierzano porcje medium 600 ml do pre-perfuzji oraz 600 ml do perfuzji dodając do tego ostatniego sól sodową [9,10-(n)-<sup>3</sup>H] kwasu palmitynowego w 16% albuminie (około 100  $\mu$ Ci / dm<sup>3</sup>). Przygotowane medium pre-perfuzyjne podłączano do systemu perfuzyjnego, a medium perfuzyjne trzymano w lodówce aż do użycia. Aktywność specyficzną medium perfuzyjnego mierzono w liczniku scyntylicyjnym Rackbeta (LKB, Szwecja) lub Tri-Carb 2100TR (Packard Instruments Co., USA) stosując scyntylator Ultima Gold (Packard Instruments BV, Holandia).

**Obliczanie stężenia w medium perfuzyjnym niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego.**

Stężenie niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego (NKP) w medium perfuzyjnym obliczone wg wzoru podanego przez Richieri i wsp. (1993):

$$[\text{NKP}] = mv + b + ce^{kv} \quad (3)$$

gdzie:

v oznacza stosunek stężenia całkowitego kwasów tłuszczowych do stężenia albuminy w medium perfuzyjnym

m, b, c, k są stabelaryzowanymi wartościami wyznaczonymi eksperymentalnie przez Richieri i wsp. (1993)

## **Metody analityczne**

### Rozdział ekstraktu lipidowego z mięśni

Początkowo, podczas doświadczeń wstępnych nie opisanych w obecnej pracy, analizy przeprowadzano w mięśniach mokrych. Stwierdzono jednak, że na głęboko zamrożonych próbkach w trakcie ważenia absorbuje się woda co powoduje błędy w odczycie masy próbek. Stąd też przed analizami dla celów obecnej pracy mięśnie liofilizowano. Po liofilizacji z próbek ekstrahowano lipidy wewnątrzkomórkowe w mieszaninie chloroformu z metanolem 2 : 1 przez około 16 godzin w temperaturze pokojowej zgodnie z metodą opisaną przez Folcha i wsp. (1957). Następnie ekstrakt lipidów zatężano i rozdzielano na frakcje.

Stosowano dwie techniki rozdziału:

1. *chromatografię cienkowarstwową*: ekstrakt lipidowy zatężano w strumieniu azotu do niewielkiej objętości (50  $\mu$ l) i nanoszono, tak jak wzorce, na płytkę TLC 20x130 mm (płytką SilicaGel Si60 F254, Merck, Niemcy, Art. 5554) w odległości 10 mm od dolnej krawędzi. Płytkę rozwijano w komorze chromatograficznej mieszaniną heptan / eter dietylowy / kwas octowy (80 : 40 : 3) (Mangold 1969). Po wysuszeniu płytki poszczególne frakcje lipidowe lokalizowano przy użyciu jodu sublimowanego.

Współczynniki retencji (Rf) identyfikowanych frakcji lipidowych wynosiły odpowiednio: triacyloglicerole 0,55, kwasy tłuszczowe 0,26, diacyloglicerole 0,15, monoacyloglicerole 0,03 oraz fosfolipidy 0,01. Następnie fragmenty płytki zawierające poszczególne frakcje lipidów wycinano i przenoszono do fiolki scyntylicyjnej zawierającej 2 ml mieszaniny chloroform / metanol (2 : 1) i pozostawiano na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po zeszkobaniu krzemionki pozostałości płytki wyjmowano,

zawartość fiolki odparowywano i dodawano 10 ml scyntylatora Ultima Gold ( Packard Instruments B.V., Holandia). Po 16 godzinach przechowywania w ciemnym pomieszczeniu, mierzono radioaktywność poszczególnych frakcji w liczniku scyntylacyjnym Rackbeta (LKB, Szwecja) lub Tri-Carb 2100TR (Packard Instruments Co., USA). Jak stwierdziliśmy w innych doświadczeniach (Górecka i wsp. 2001) kwasy tłuszczowe obecne w ekstrakcie z mięśni pochodzą praktycznie w całości z przestrzeni pozakomórkowej, w związku z czym powyższą techniką nie można było określić wielkości puli wewnątrzkomórkowych kwasów tłuszczowych.

2. *chromatografię na kolumnie Florisil®*: 7% uwodniony Florisil® przygotowywano wytrząsając przez 16 godzin z odpowiednią ilością wody destylowanej aktywowany Florisil® 100-200 mesh (Sigma Chemical Co., USA, Art. F7752), następnie złoże zawieszano w mieszaninie eteru dietylowego i metanolu (98:2) i przygotowywano kolumnienki 10x30 mm. Ekstrakt lipidowy zatężano w strumieniu azotu do niewielkiej objętości (100-200 µl), nanoszono na kolumnienkę i eluowano 10 ml mieszaniny eteru dietylowego i metanolu (98:2) (Carrol 1976, Carrol i Serdarevich 1967). Eluat zawierający acyloglicerole (monoacyloglicerole, diacyloglicerole, triacyloglicerole) odparowywano w strumieniu azotu i zalewano 10 ml scyntylatora Ultima Gold ( Packard Instruments B.V., Holandia). Następnie, po 16 godzinach przechowywania w ciemnym pomieszczeniu, mierzono radioaktywność eluatu w liczniku scyntylacyjnym Rackbeta (LKB, Szwecja) lub Tri-Carb 2100TR (Packard Instruments Co., USA). Wbudowywanie w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe obliczano na podstawie aktywności specyficznej medium perfuzyjnego i przeliczano na gram suchej masy (Równanie 4).

$$\text{wbudowywanie} = \frac{\text{aktywność eluatu [cpm]}}{\text{aktywność medium [cpm / mmol] x masa próbki [mg]}} \quad (4)$$

[µmol / g]

Metoda została sprawdzona przed doświadczeniami w sposób następujący: czystość izotopowa tri[1-<sup>14</sup>C]oleinianu glicerolu (Amersham Life Science, Wielka Brytania, Art. CFA258) została sprawdzona przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej (płytki SilicaGel Si60 F254, Merck, Niemcy, Art. 5554, medium

rozwijające: heptan / eter dietylowy / kwas octowy, 80 : 40 : 3, detekcja parami jodu) i wynosiła ona 99%. Znaną ilość tri[1-<sup>14</sup>C]oleinianu glicerolu dodano do 200 µl ekstraktu lipidowego uzyskanego z ok. 200 mg mięśni łydki szczura w mieszaninie chloroformu z metanolem (2 : 1). Całość naniesiono na kolumnkę 10x30 mm 7% uwodnionego Florisilu® i eluowano 10 ml mieszaniny eteru dietylowego z metanolem (98 : 2). Eluat odparowano w strumieniu azotu i zmierzono aktywność izotopową. Tri[1-<sup>14</sup>C]oleinian glicerolu został odzyskany w 98,6%. Identycznie postąpiono z [9,10-(n)-<sup>3</sup>H] kwasem palmitynowym (Amersham Life Sciences, Wielka Brytania, Art. TRK 760), którego czystość izotopowa wynosiła 93%, natomiast eluat wykazywał 7,8% aktywności początkowej. Z uwagi na fakt, że czystość izotopowa [9,10-(n)-<sup>3</sup>H] kwasu palmitynowego wynosiła 93% uznano, że metoda w sposób blisko ilościowy pozwala na rozdzielenie triacylogliceroli od kwasów tłuszczowych zatrzymywanych na kolumnie.

#### Oznaczenie stężenia kwasów tłuszczowych we krwi.

Kwasy tłuszczowe we krwi oznaczano przy pomocy spektrofotometrycznego, enzymatycznego testu do oznaczania kwasów tłuszczowych (Boehringer Mannheim, Niemcy, Free Fatty Acids – Half Micro Test, Art. 1383 175) opartym na metodzie Shimizu i wsp. (1980). Metoda ta polega na przekształceniu przez syntetazę acylo-CoA (EC 6.2.1.3) kwasów tłuszczowych w ich pochodne z koenzymem A, które następnie wskutek działania oksydazy acylo-CoA przekształcane są w enoilo-koenzym A z jednoczesnym uwolnieniem nadtlenu wodoru. Z kolei nadtlenek wodoru reaguje z 4-aminoantypiryną oraz kwasem 2,4,6-trzybromo-3-hydroksybenzoesowym w wyniku czego powstaje czerwony barwnik zmieniający absorbancję próbki przy długości fali 546 nm. Zawartość kwasów tłuszczowych w próbce oblicza się na podstawie zmiany absorbancji próbki. Powyższą metodę można stosować do stężeń kwasów tłuszczowych nie przekraczających 1.5 mM. Przy wyższych stężeniach próbki należy odpowiednio rozcieńczyć solą fizjologiczną.

### Oznaczanie zawartości glikogenu w wątrobie.

Glikogen oznaczano według metody Harrisa i wsp. (1974). Do oznaczeń pobierano próbki świeżej tkanki (20-30 mg), które umieszczano w zamykanej szklanej probówce z kapilarą zawierającą 1 ml 1N kwasu solnego i gotowano we wrzącej łaźni wodnej (100 °C) przez 135 minut. Następnie całość schładzano do temperatury pokojowej, pobierano 100 µl roztworu, który zobojętniano do pH 7,0 przy pomocy 70 µl 21% roztworu wodorowęglanu potasu. Powstałą glukozę oznaczano stosując testy (Boehringer Mannheim, Niemcy, Art. 124010). Po poddaniu glukozy działaniu oksydazy glukozowej (EC 1.1.3.4) wytworzony zostaje nadtlenek wodoru, który następnie reagując z ABTS (sól dwuamoniowa 2,2'-azyno-di-[sulfonianu 3-etylobenzotiazoliny] w obecności peroksydazy (EC 1.11.1.7) powoduje zmianę zabarwienia próbki. Na podstawie zmian absorbancji próbki przy długości fali 578 nm oblicza się zawartość glikogenu.

### **Statystyczne opracowanie wyników**

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne +/- błąd standardowy. Dla zbadania normalności rozkładu wyników stosowano test Shapiro-Wilka. Jednorodność wariancji badano przy użyciu testu Lavene'a. W przypadku potwierdzenia jednorodności wariancji istotność statystyczną występujących różnic oceniano stosując analizę wariancji ANOVA/MANOVA, a następnie test Spjotvoll-Stoline, który pozwala porównywać grupy o nierównej liczebności. W przypadkach gdy nie stwierdzono jednorodności wariancji stosowano statystykę nieparametryczną, test ANOVA rang Kruskala-Wallisa, który również pozwala porównywać grupy o nierównej liczebności. Różnicę uznawano za istotną statystycznie przy  $p < 0,05$ . Stosowano także analizę regresji dla obliczania współzależności między niektórymi danymi.

## 5. Wyniki

### 5.1 Wbudowywanie kwasu palmitynowego w lipidy wewnątrzmięśniowe w zależności od czasu trwania perfuzji

#### Wbudowywanie w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe

Stwierdzono, że wraz z wydłużaniem czasu perfuzji medium zawierającym 4% albuminy i 1.0 mM kwasu palmitynowego (KP) od 30 poprzez 45 do 60 minut wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe (mono-, di- oraz triacyloglicerole) rośnie liniowo we wszystkich badanych typach mięśni na co wskazują istotne współczynniki korelacji (Tab. 2).

Spośród ocenianych mięśni największe wbudowywanie KP w acyloglicerole w wartościach absolutnych stwierdzono w czerwonej części mięśnia czworogłowego uda (Tab. 2). Wbudowywanie po 45 min. perfuzji było istotnie wyższe ( $p < 0,001$ ) niż po 30 min., natomiast wbudowywanie po 60 min. było istotnie wyższe ( $p < 0,001$ ) niż po 45 min. Współczynnik korelacji liniowej  $r$  wynosił 0,95 ( $p < 0,001$ ). Mniejsze wbudowywanie KP (Tab. 2) odnotowano w mięśniu płaszczkowatym ( $r = 0,95$ ,  $p < 0,001$ ), w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki ( $r = 0,87$ ,  $p < 0,001$ ) i dalej w mięśniu podeszwowym ( $r = 0,84$ ,  $p < 0,001$ ). Również w przypadku tych mięśni wbudowywanie KP w acyloglicerole po 45 min. perfuzji było istotnie wyższe niż po 30 min., a wbudowywanie po 60 min. istotnie wyższe niż po 45 min perfuzji (poziomy istotności przedstawiono w Tab.2).

W mięśniach szybko kurczących glikolitycznych tzn. białej części mięśnia brzuchatego łydki i białej części mięśnia czworogłowego uda, stwierdzono najmniejsze wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe (Tab. 2). W obu tych mięśniach odnotowano istotne różnice pomiędzy 45 i 30 min. perfuzji, natomiast wbudowywanie po 60 min. było istotnie wyższe niż po 45 min. Współczynnik korelacji liniowej  $r$  wynosił odpowiednio 0,68 ( $p < 0,01$ ) oraz 0,69 ( $p < 0,01$ ).

Tab. 2.

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w zależności od czasu trwania perfuzji medium zawierającym 1,0 mM kwasu palmitynowego i 4% albuminy wołowej.

MIĘSIĘŃ	30 min.	45 min.	60 min.
Czerwona część mięśnia czworogłowego uda	1,41 ± 0,09 (n=31)	3,52 ± 0,33 (n=8) <sup>++</sup>	6,36 ± 0,16 (n=6) <sup>++</sup>
Mięsień płaszczkowaty	1,08 ± 0,07 (n=26)	3,05 ± 0,29 (n=8) <sup>++</sup>	5,63 ± 0,28 (n=6) <sup>++</sup>
Czerwona część mięśnia brzuchatego łydki	1,14 ± 0,08 (n=31)	2,43 ± 0,23 (n=8) <sup>++</sup>	3,95 ± 0,30 (n=6) <sup>+</sup>
Mięsień podeszwowy	0,84 ± 0,07 (n=28)	1,73 ± 0,24 (n=8) <sup>+</sup>	2,95 ± 0,29 (n=6) <sup>++</sup>
Biała część mięśnia brzuchatego łydki	0,45 ± 0,05 (n=29)	0,71 ± 0,06 (n=8) <sup>++</sup>	1,28 ± 0,21 (n=6) <sup>++</sup>
Biała część mięśnia czworogłowego uda	0,77 ± 0,08 (n=31)	1,14 ± 0,10 (n=8) <sup>+</sup>	1,93 ± 0,15 (n=6) <sup>++</sup>

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy w  $\mu\text{mol}$  kwasu palmitynowego / g suchej masy.

W nawiasach podano liczbę próbek.

(+) oznacza różnicę istotną statystycznie pomiędzy wartością uzyskaną dla danego punktu doświadczalnego i wartością dla poprzedniego punktu (+:  $p < 0,05$ , ++:  $p < 0,01$ ). Zastosowano test ANOVA rang Kruskala-Wallis.

**Wbudowywanie kwasu palmitynowego w lipidy wewnątrzmięśniowe**  
**wyrażone w procentach w zależności od czasu trwania perfuzji**

Względne wbudowywanie kwasu palmitynowego wyrażone w procentach we frakcje triacylogliceroli (TG), diacylogliceroli / monoacylogliceroli (DG/MG) oraz fosfolipidów (PL) w mięśniach o różnym składzie włókien w zależności od czasu trwania perfuzji (30, 45 lub 60 min.) przedstawiono w Tab. 3A – Tab. 3F. Za 100% przyjęto sumaryczne wbudowywanie w badane frakcje lipidów.

Stwierdzono, że względne wbudowywanie KP w lipidy wewnątrzkomórkowe praktycznie nie zależy od czasu trwania perfuzji w zastosowanym przedziale czasowym. We wszystkich typach mięśni procentowo najwięcej KP zostało wbudowane w triacyloglicerole, przy czym procent ten był największy (ponad 70%) w mięśniu płaszczkowatym oraz w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki i czworogłowego uda. Procentowe wbudowywanie w DG/MG nie zmieniało się istotnie wraz ze wzrostem czasu trwania perfuzji za wyjątkiem czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki w której wbudowywanie w DG/MG po 60 min. było istotnie niższe niż po 45 min, ale nie różniło się istotnie od wbudowywania po 30 min. Procentowe wbudowywanie w fosfolipidy było we wszystkich typach mięśni niewielkie, rzędu kilku procent. W białej części mięśnia brzuchatego łydki procent KP wbudowanego w PL po 60 min. był istotnie niższy od wartości uzyskanej dla 45 min. perfuzji oraz istotnie niższy od wartości dla 30 min.



Tab. 3.

Procentowe wbudowywanie kwasu palmitynowego w wewnątrzmięśniowe triacyloglicerole (TG), diacyloglicerole / monoacyloglicerole (DG/MG) oraz fosfolipidy (PL) mięśni kończyn tylnych szczura w zależności od czasu trwania perfuzji. Medium zawierało 1 mM kwasu palmitynowego i 4% albuminy wołowej.

## A. Czerwona część mięśnia czworogłowego uda

	30 min.	45 min.	60 min.
TG (%)	73,6 ± 2,6 (8)	75,9 ± 3,1 (6)	75,2 ± 6,7 (8)
DG/MG (%)	15,6 ± 1,0 (7)	18,8 ± 2,3 (5)	18,8 ± 3,1 (7)
PL (%)	3,8 ± 0,6 (8)	3,4 ± 0,6 (6)	2,0 ± 0,6 (7)

## B. Mięsień płaszczkowy

	30 min.	45 min.	60 min.
TG (%)	72,6 ± 4,7 (8)	75,9 ± 3,7 (6)	77,6 ± 3,0 (8)
DG/MG (%)	16,7 ± 1,8 (7)	15,7 ± 2,6 (5)	18,8 ± 1,8 (8)
PL (%)	5,1 ± 1,0 (7)	4,4 ± 0,6 (6)	3,1 ± 0,8 (8)

## C. Czerwona część mięśnia brzuchatego łydki

	30 min.	45 min.	60 min.
TG (%)	72,4 ± 2,8 (8)	63,8 ± 6,1 (6)	75,3 ± 4,8 (8)
DG/MG (%)	20,4 ± 1,8 (7)	26,0 ± 5,2 (6)	12,9 ± 1,4 (8)*
PL (%)	4,5 ± 0,8 (8)	5,0 ± 0,9 (6)	2,5 ± 0,3 (6)

## D. Mięsień podeszwowy

	30 min.	45 min.	60 min.
TG (%)	64,6 ± 4,0 (8)	68,1 ± 3,9 (5)	73,9 ± 2,4 (8)
DG/MG (%)	22,3 ± 1,9 (8)	25,4 ± 3,0 (5)	18,8 ± 1,8 (7)
PL (%)	5,1 ± 1,0 (7)	4,7 ± 0,7 (6)	2,7 ± 0,3 (7)

## E. Biała część mięśnia brzuchatego łydki

	30 min.	45 min.	60 min.
TG (%)	44,2 ± 2,9 (7)	39,5 ± 4,0 (6)	44,4 ± 6,8 (8)
DG/MG (%)	35,9 ± 2,7 (7)	39,1 ± 4,4 (6)	37,9 ± 1,9 (7)
PL (%)	11,2 ± 2,0 (8)	8,1 ± 0,5 (6)	5,4 ± 0,9 (7) *#

## F. Biała część mięśnia czworogłowego uda

	30 min.	45 min.	60 min.
TG (%)	64,5 ± 3,1 (8)	61,9 ± 6,8 (6)	56,4 ± 3,2 (8)
DG/MG (%)	24,5 ± 2,6 (8)	23,5 ± 4,2 (5)	26,6 ± 1,2 (6)
PL (%)	5,4 ± 0,6 (7)	5,8 ± 0,9 (6)	4,4 ± 0,9 (8)

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy.

W nawiasach podano liczbę próbek.

(\*) oznacza różnicę istotną statystycznie ( $p < 0,05$ ) w danym wierszu pomiędzy wartościami dla 45 min i 60 min

(#) oznacza różnicę istotną statystycznie ( $p < 0,05$ ) w danym wierszu pomiędzy wartościami dla 30 min i 60 min

## 5.2. Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w zależności od stężenia kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym

### Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy rosnącym całkowitym stężeniu kwasów palmitynowego i rosnącym stężeniu niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym

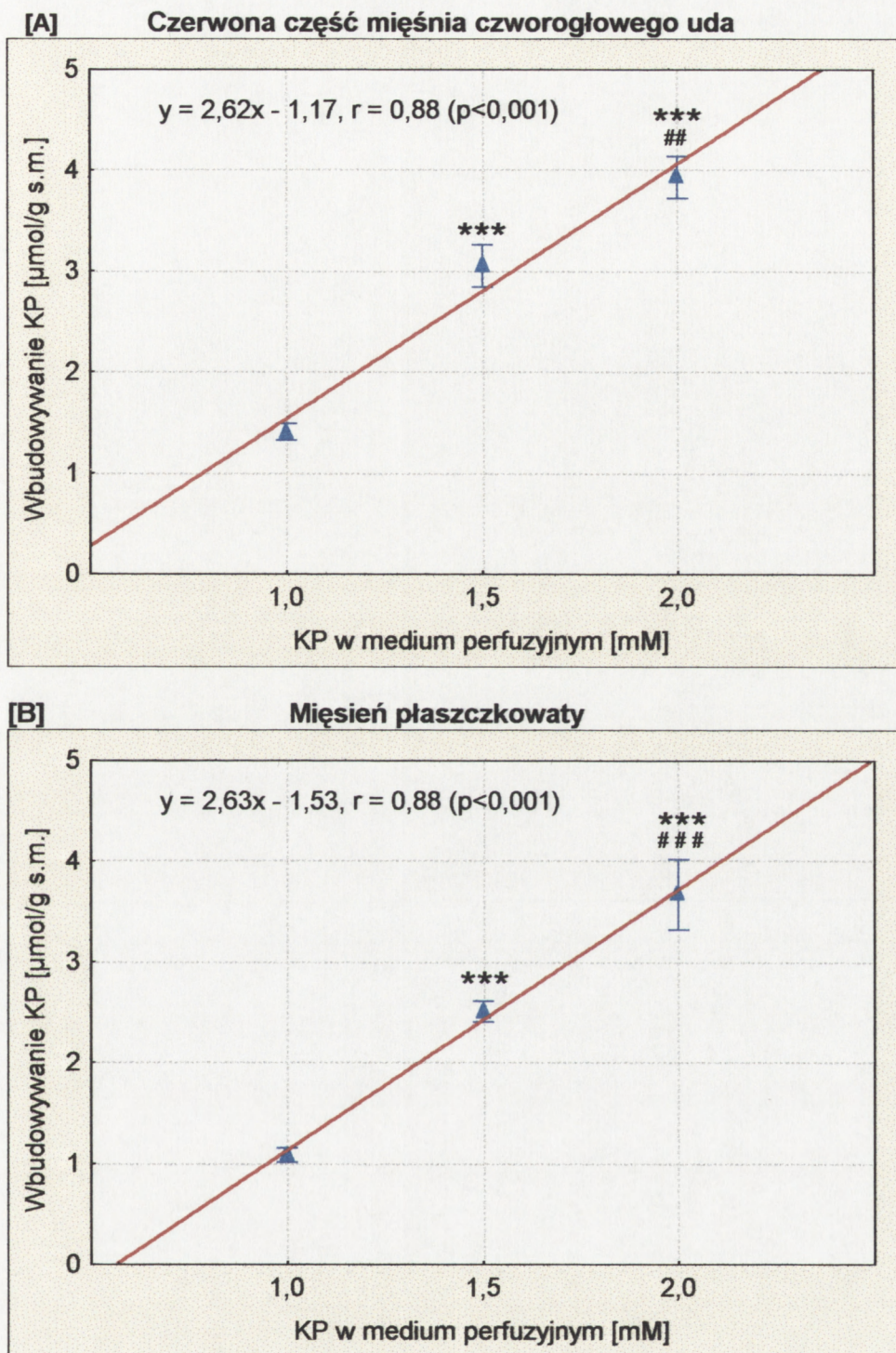
Zbadano wbudowywanie kwasu palmitynowego (KP) w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe (mono-, di- oraz triacyloglicerole) podczas 30 min. perfuzji medium zawierającym wzrastające całkowite stężenie kwasu palmitynowego [KP], 1,0 lub 1,5 lub 2,0 mM, przy 4% stężeniu albuminy. W tych warunkach stosunek całkowitego stężenia kwasu palmitynowego [KP] do stężenia albuminy ( $v$ ) wynosił odpowiednio 1,70, 2,55 oraz 3,40, natomiast stężenie niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego [NKP] 9,10, 15,62 i 26,80 nM (Richieri i wsp. 1993).

Stwierdzono, że wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP w medium perfuzyjnym wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe wzrastało. W wartościach bezwzględnych było ono największe w czerwonej części mięśnia czworogłowego uda (Ryc. 3A) pośród wszystkich ocenianych mięśni. Wartości średnie, błąd standardowy oraz liczbę próbek podano w Tab. 4. Nieco mniejsze wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe lecz o podobnym przebiegu zmian stwierdzono w mięśniu płaszczkowatym (Ryc. 3B, Tab. 4), w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 4A, Tab. 4) oraz w mieszanym mięśniu podeszwowym (Ryc. 4B, Tab. 4). W przypadku mięśnia podeszwowego różnica pomiędzy wbudowywaniem przy 1,5 i 2,0 mM nie była istotna statystycznie, co sugeruje tendencję do wysycania się procesu.

W białych częściach mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 5A, Tab. 4) i czworogłowego uda (Ryc. 5B, Tab. 4) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe było znacznie mniejsze niż w pozostałych badanych mięśniach. W białej części mięśnia

brzuchatego łydki wbudowywanie KP przy 1,5 i 2,0 mM KP nie różniło się istotnie, natomiast w obu przypadkach było ono istotnie wyższe od wbudowywania przy 1,0 mM KP. Z kolei w białej części mięśnia czworogłowego uda stwierdzono jedynie tendencję do wzrostu, a istotny wzrost odnotowano tylko przy 2,0 mM w porównaniu do 1,0 mM.

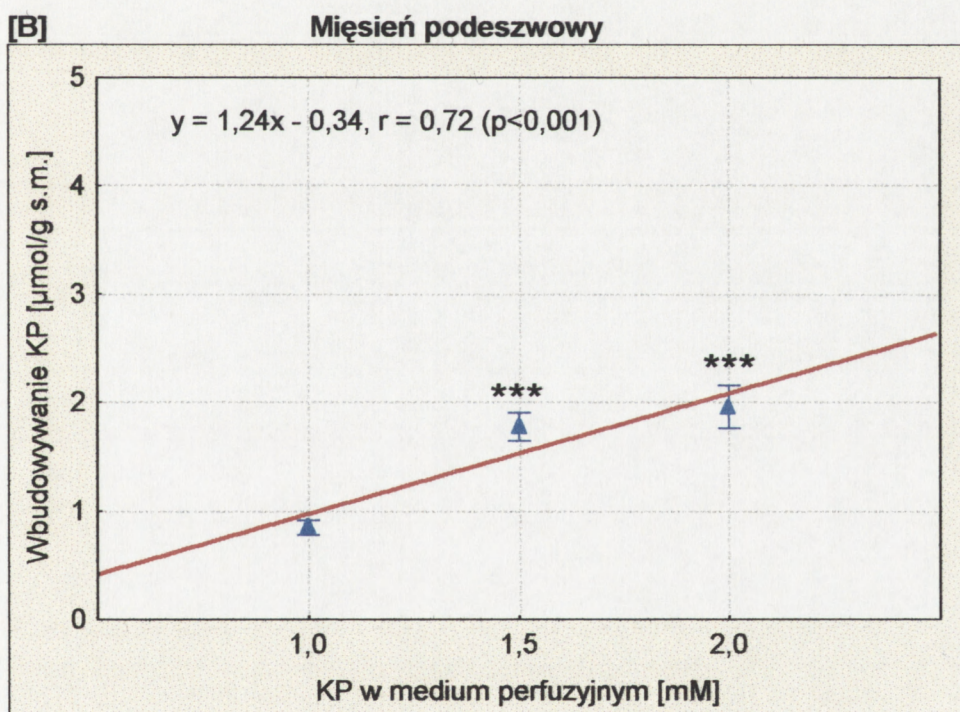
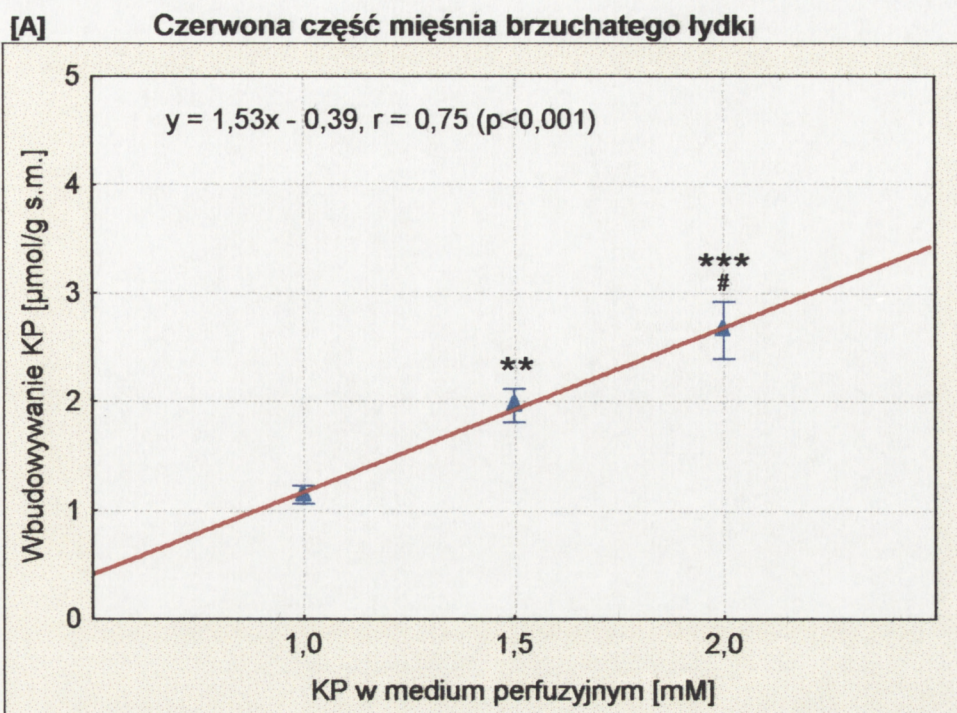
We wszystkich badanych mięśniach wzrost wbudowywania KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w tej sytuacji doświadczalnej miał charakter liniowy. Najwyższe współczynniki korelacji (zaznaczone na odpowiednich rysunkach) odnotowano w przypadku czerwonej części mięśnia czworogłowego uda oraz mięśnia płaszczkowatego, najniższe zaś w przypadku białych części mięśnia brzuchatego łydki oraz czworogłowego uda.



**Ryc. 3**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i jednocześnie wzrastającym [NKP] w medium perfuzyjnym. Medium zawierało 4% albuminy wołowej. Czas perfuzji 30 min. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Na wykresie podano równanie regresji oraz współczynnik korelacji  $r$ .

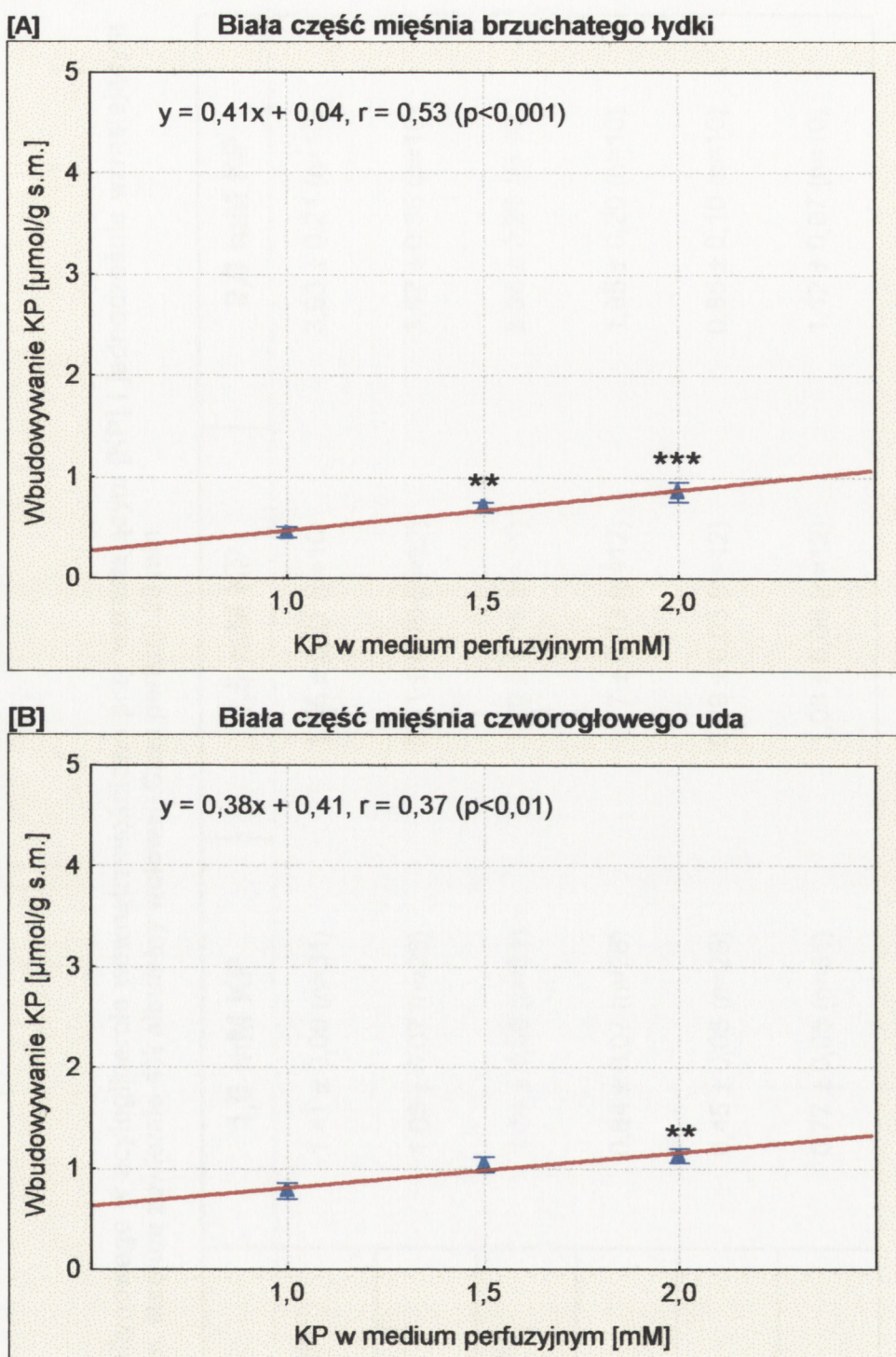
- (\*) oznacza różnicę istotną statystycznie (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) pomiędzy danym stężeniem i wartością dla 1,0 mM
- (#) oznacza różnicę istotną statystycznie (##:  $p < 0,01$ , ###:  $p < 0,001$ ) pomiędzy stężeniem 2,0 i 1,5 mM



**Ryc. 4**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i jednocześnie wzrastającym [NKP] w medium perfuzyjnym. Medium zawierało 4% albuminy wołowej. Czas perfuzji 30 min. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Na wykresie podano równanie regresji oraz współczynnik korelacji  $r$ .

- (\*) oznacza różnicę istotną statystycznie (\*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ) pomiędzy danym stężeniem i wartością dla 1,0 mM
- (#) oznacza różnicę istotną statystycznie (:  $p < 0,05$ ) pomiędzy stężeniem 2,0 i 1,5 mM



**Ryc. 5**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i jednocześnie wzrastającym [NKP] w medium perfuzyjnym. Medium zawierało 4% albuminy wołowej. Czas perfuzji 30 min. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Na wykresie podano równanie regresji oraz współczynnik korelacji  $r$ .

(\*) oznacza różnicę istotną statystycznie (\*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ) pomiędzy danym stężeniem i wartością dla 1,0 mM

Tab. 4.

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i jednocześnie wzrastającym [NKP] w medium perfuzyjnym. Medium zawierało 4% albuminy wołowej. Czas perfuzji 30 min.

MIĘSIEŃ	1,0 mM KP	1,5 mM KP	2,0 mM KP
Czerwona część mięśnia czworogłowego uda	1,41 ± 0,09 (n=31)	3,05 ± 0,21 (n=10)	3,93 ± 0,21 (n=10)
Mięsień płaszczkowaty	1,08 ± 0,07 (n=26)	2,51 ± 0,10 (n=12)	3,67 ± 0,35 (n=10)
Czerwona część mięśnia brzuchatego łydki	1,14 ± 0,08 (n=31)	1,96 ± 0,15 (n=11)	2,66 ± 0,26 (n=10)
Mięsień podeszwowy	0,84 ± 0,07 (n=28)	1,77 ± 0,13 (n=12)	1,95 ± 0,20 (n=10)
Biała część mięśnia brzuchatego łydki	0,45 ± 0,05 (n=29)	0,69 ± 0,05 (n=12)	0,85 ± 0,10 (n=10)
Biała część mięśnia czworogłowego uda	0,77 ± 0,08 (n=31)	1,03 ± 0,08 (n=12)	1,12 ± 0,07 (n=10)

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy w  $\mu\text{mol}$  kwasu palmitynowego / g suchej masy. W nawiasach podano liczbę próbek.

**Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym całkowitym stężeniu kwasu palmitynowego i stałym stężeniu niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym**

W kolejnej serii doświadczeń zbadano zależność wbudowywania kwasu palmitynowego (KP) w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe (mono-, di- oraz triacyloglicerole) od stężenia całkowitego tego kwasu w medium perfuzyjnym (1,0, 1,5 i 2,0 mM) w warunkach gdy stężenie niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym (NKP) było stałe i wynosiło 9,10 nM. Aby uzyskać takie warunki doświadczalne perfuzję prowadzono przy użyciu medium zawierającego 1,0 mM KP i 4% albuminy, 1,5 mM KP i 6% albuminy, bądź 2,0 mM KP i 8% albuminy. W powyższych warunkach stosunek (v) całkowitego stężenia kwasu palmitynowego [KP] do stężenia albuminy był stały i wynosił 1,70. Czas perfuzji wynosił 30 min.

W czerwonej części mięśnia czworogłowego uda wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe (Ryc. 6A, Tab. 5) przy 1,0 mM KP było istotnie niższe niż przy 1,5 mM ( $p < 0,05$ ) i 2,0 mM ( $p < 0,001$ ) KP. Wbudowywanie przy 1,5 mM i 2,0 mM KP nie różniło się istotnie. Wartości otrzymane przy 1,5 mM KP i 2,0 mM KP były istotnie (odpowiednio  $p < 0,001$  i  $p < 0,01$ ) niższe od uzyskanych przy takich samych stężeniach całkowitych KP w doświadczeniu gdy jednocześnie wzrastało stężenie KP jak i NKP. Podobną odmienność charakteru zmian wykazano w mięśniu płaszczkowatym (Ryc. 6B, Tab. 5) i w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 7A, Tab. 5) W mięśniach tych stwierdzono, że wbudowywanie przy 2,0 mM KP było istotnie wyższe niż przy 1,0 mM KP oraz przy 1,5 mM KP, przy czym wartości otrzymane przy 1,5 mM KP i 2,0 mM KP były istotnie statystycznie niższe od wyników uzyskanych dla tych samych stężeń KP w warunkach gdy zwiększano zarówno całkowite stężenie KP jak i NKP. Wartości p przedstawiono na Ryc. 6B i 7A. W mięśniu podeszwowym (Ryc. 7B, Tab. 5) wbudowywanie przy 1,0 mM KP było istotnie niższe niż przy 1,5 mM ( $p < 0,05$ ) i 2,0 mM ( $p < 0,001$ ) KP. Z kolei wbudowywanie przy 1,5 mM było istotnie niższe niż przy 2,0 mM

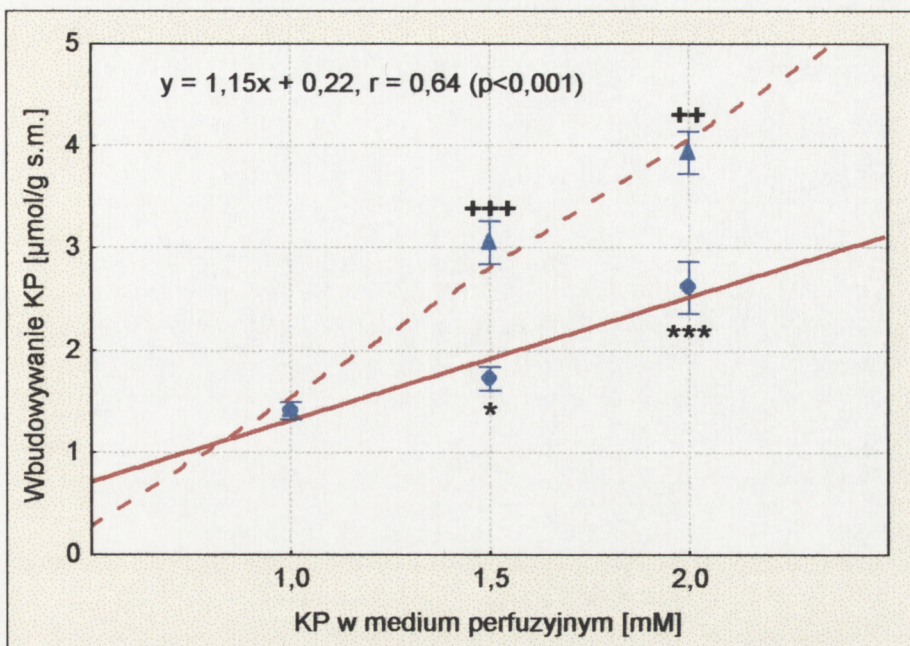


KP ( $<0,001$ ). Wartości uzyskane w obecnej serii doświadczalnej przy 1,5 mM i 2,0 mM KP były istotnie niższe (odpowiednio  $p<0,01$  i  $p<0,05$ ) niż wartości uzyskane w serii doświadczalnej, w której wzrostowi całkowitego stężenia KP towarzyszył wzrost stężenia NKP.

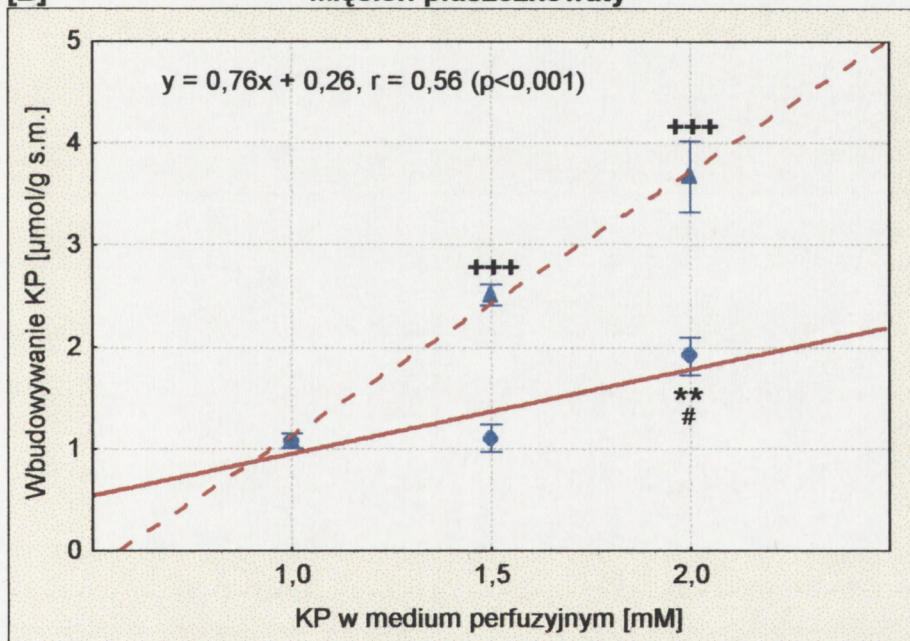
W białej części mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 8A, Tab. 5) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe pomiędzy 1,0 i 1,5 mM KP oraz 1,5 i 2,0 mM KP nie różniło się istotnie statystycznie. Tylko wbudowywanie KP przy 1,0 i 2,0 mM KP było istotnie różne ( $p<0,01$ ). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami uzyskanymi w poprzednich doświadczeniach w których jednocześnie zwiększano stężenie KP oraz NKP i obecnymi doświadczeniami w których zwiększano tylko KP utrzymując NKP na stałym poziomie. Bardzo podobnie przedstawiało się wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w białej części mięśnia czworogłowego uda (Ryc. 8B, Tab. 5). W przypadku tego mięśnia nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic we wbudowywaniu KP przy różnych całkowitych stężeniach KP, natomiast wbudowywanie przy 1,5 mM KP było istotnie niższe ( $p<0,05$ ) niż w doświadczeniach w których zwiększano zarówno stężenie KP jak i NKP.

Podsumowując, wyniki uzyskane w powyższej serii doświadczalnej sugerują, że w mięśniach o przewadze włókien tlenowych i tlenowo-glikolitycznych, niezależnie od stężenia NKP w medium perfuzyjnym, wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP wzrasta również wbudowywanie KP w acyloglicerole tych mięśni. Odmiennie zachowywały się mięśnie o przewadze włókien glikolitycznych w których, w powyższych warunkach, nie stwierdzono istotnego wzrostu wbudowywania KP w acyloglicerole tych mięśni.

[A] Czerwona część mięśnia czworogłowego uda



[B] Mięsień płaszczkowy



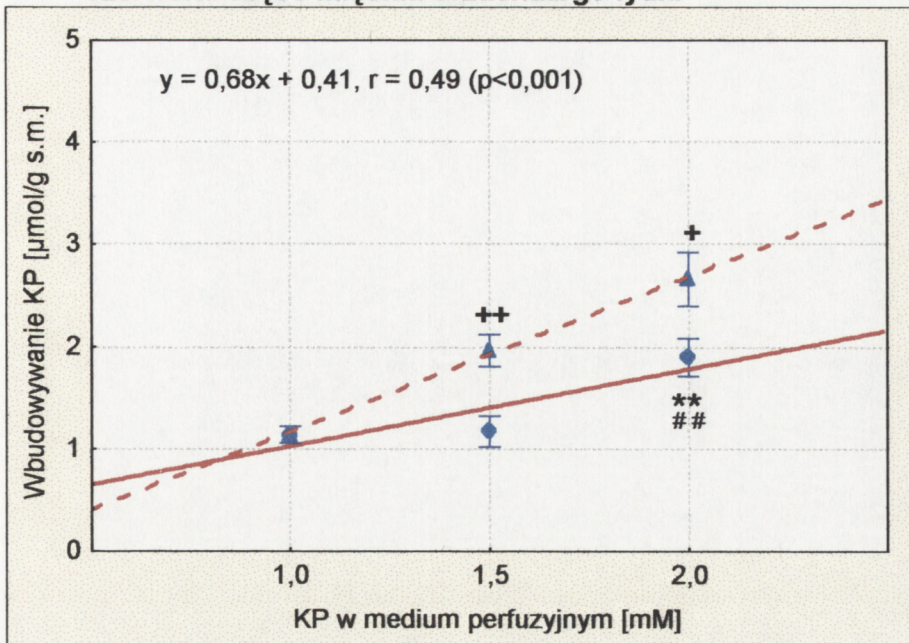
Ryc. 6

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i stałym [NKP] w medium perfuzyjnym. Czas perfuzji 30 min. Wyniki (romby i linia ciągła) przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Na wykresie podano równanie regresji oraz współczynnik korelacji  $r$ . Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP przy jednocześnie wzrastającym [KP] i [NKP].

- (\*) oznacza różnicę istotną statystycznie (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ) pomiędzy danym stężeniem i wartością dla 1,0 mM
- (#) oznacza różnicę istotną statystycznie (#:  $p < 0,05$ ) pomiędzy stężeniem 2,0 i 1,5 mM
- (+) oznacza różnicę istotną statystycznie (+:  $p < 0,01$ , ++:  $p < 0,001$ ) pomiędzy wartościami uzyskanymi przy jednocześnie wzrastającym [KP] i [NKP] oraz wzrastającym [KP] i stałym [NKP]

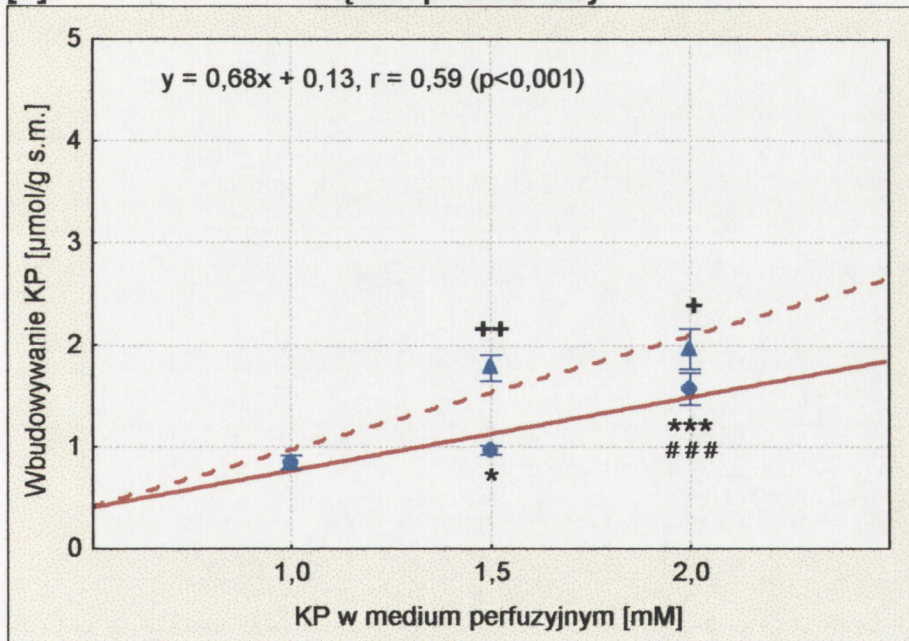
[A]

## Czerwona część mięśnia brzuchatego łydki



[B]

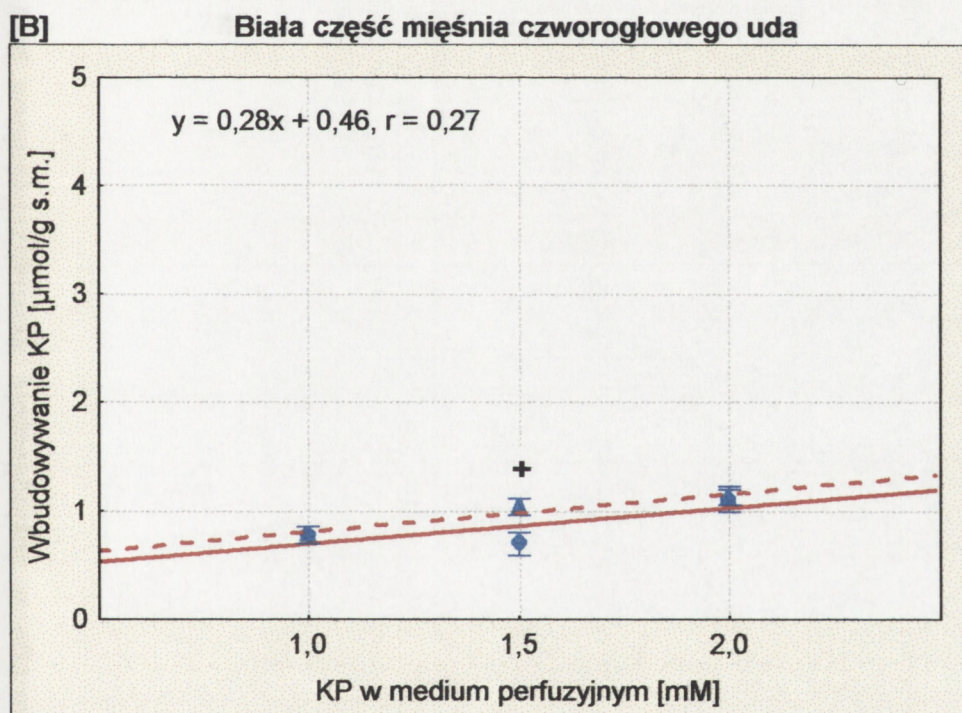
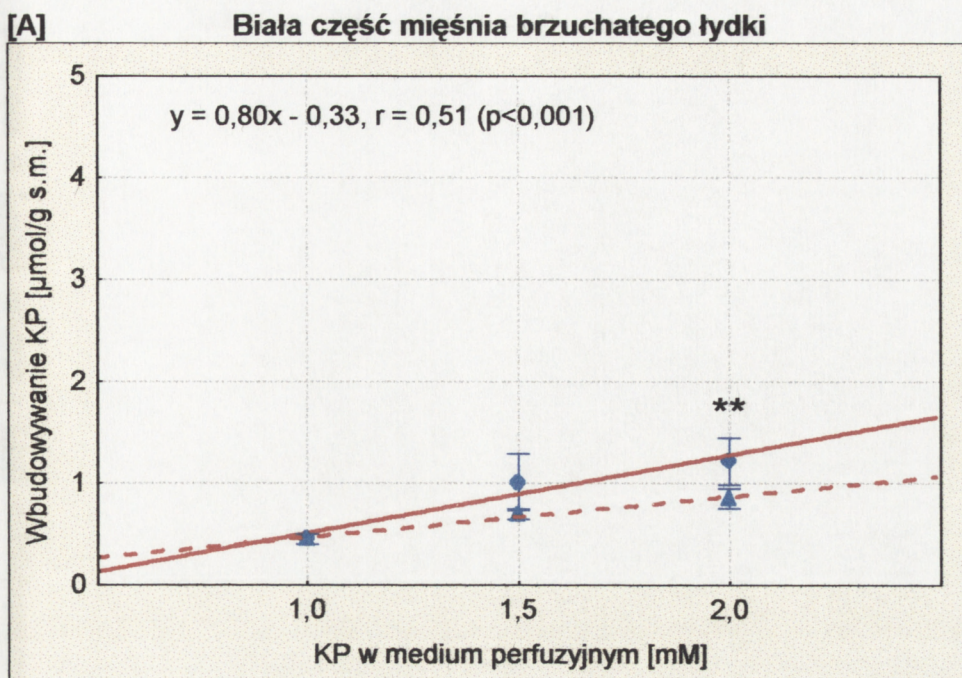
## Mięsień podeszwy



## Ryc. 7

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i stałym [NKP] w medium perfuzyjnym. Czas perfuzji 30 min. Wyniki (romby i linia ciągła) przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Na wykresie podano równanie regresji oraz współczynnik korelacji  $r$ . Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP przy jednocześnie wzrastającym [KP] i [NKP].

- (\*) oznacza różnicę istotną statystycznie (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ) pomiędzy danym stężeniem i wartością dla 1,0 mM
- (#) oznacza różnicę istotną statystycznie (##:  $p < 0,01$ , ###:  $p < 0,001$ ) pomiędzy 2,0 i 1,5 mM
- (+) oznacza różnicę istotną statystycznie (+:  $p < 0,05$ , ++:  $p < 0,01$ ) pomiędzy wartościami uzyskanymi przy jednocześnie wzrastającym [KP] i [NKP] oraz wzrastającym [KP] i stałym [NKP]



**Ryc. 8**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloliglycerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i stałym [NKP] w medium perfuzyjnym. Czas perfuzji 30 min. Wyniki (romby i linia ciągła) przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Na wykresie podano równanie regresji oraz współczynnik korelacji  $r$ . Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP przy jednocześnie wzrastającym [KP] i [NKP].

- (\*) oznacza różnicę istotną statystycznie (\*\*:  $p < 0,01$ ) pomiędzy danym stężeniem i wartością dla 1,0 mM
- (+) oznacza różnicę istotną statystycznie (+:  $p < 0,05$ ) pomiędzy wartościami uzyskanymi przy jednocześnie wzrastającym [KP] i [NKP] oraz wzrastającym [KP] i stałym [NKP]

Tab. 5.

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym [KP] i stałym [NKP] w medium perfuzyjnym. Czas perfuzji 30 min.

MIĘSIEŃ	1,0 mM KP	1,5 mM KP	2,0 mM KP
Czerwona część mięśnia czworogłowego uda	1,41 ± 0,09 (n=31)	1,72 ± 0,12 (n=10)	2,61 ± 0,26 (n=12)
Mięsień płaszczkowaty	1,08 ± 0,07 (n=26)	1,10 ± 0,13 (n=10)	1,91 ± 0,19 (n=12)
Czerwona część mięśnia brzuchatego łydki	1,14 ± 0,08 (n=31)	1,16 ± 0,15 (n=10)	1,89 ± 0,18 (n=12)
Mięsień podeszwowy	0,84 ± 0,07 (n=28)	0,96 ± 0,05 (n=9)	1,56 ± 0,16 (n=12)
Biała część mięśnia brzuchatego łydki	0,45 ± 0,05 (n=29)	1,01 ± 0,28 (n=10)	1,21 ± 0,23 (n=12)
Biała część mięśnia czworogłowego uda	0,77 ± 0,08 (n=31)	0,68 ± 0,11 (n=10)	1,10 ± 0,12 (n=12)

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy w  $\mu\text{mol}$  kwasu palmitynowego / g suchej masy. W nawiasach podano liczbę próbek.

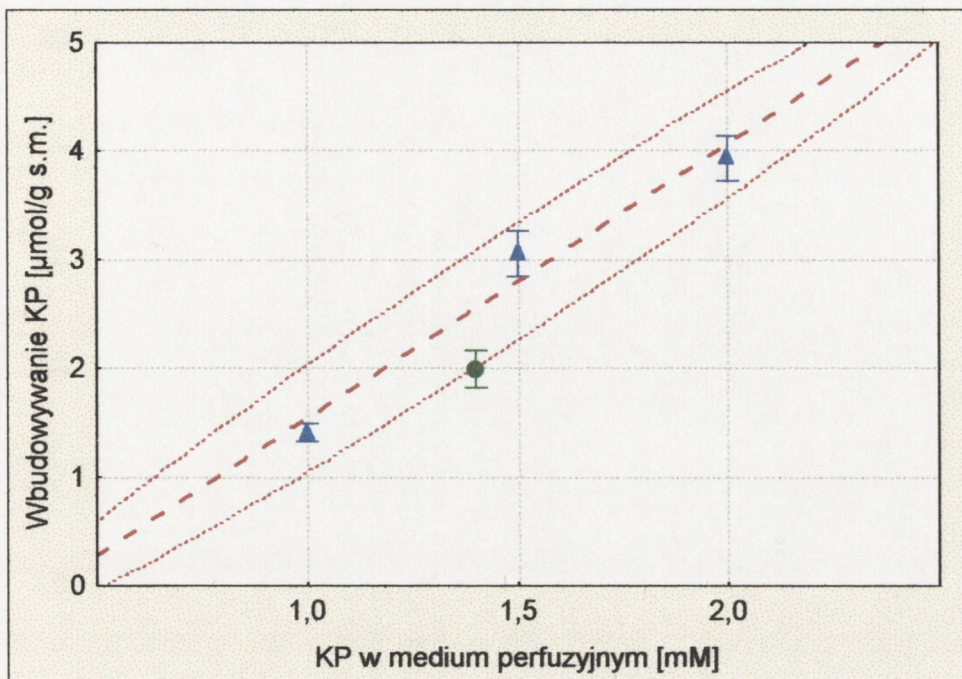
### 5.3 Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w wybranych sytuacjach fizjologicznych

#### Szczury poddane 12 godzinnej ekspozycji na zimno (6°C).

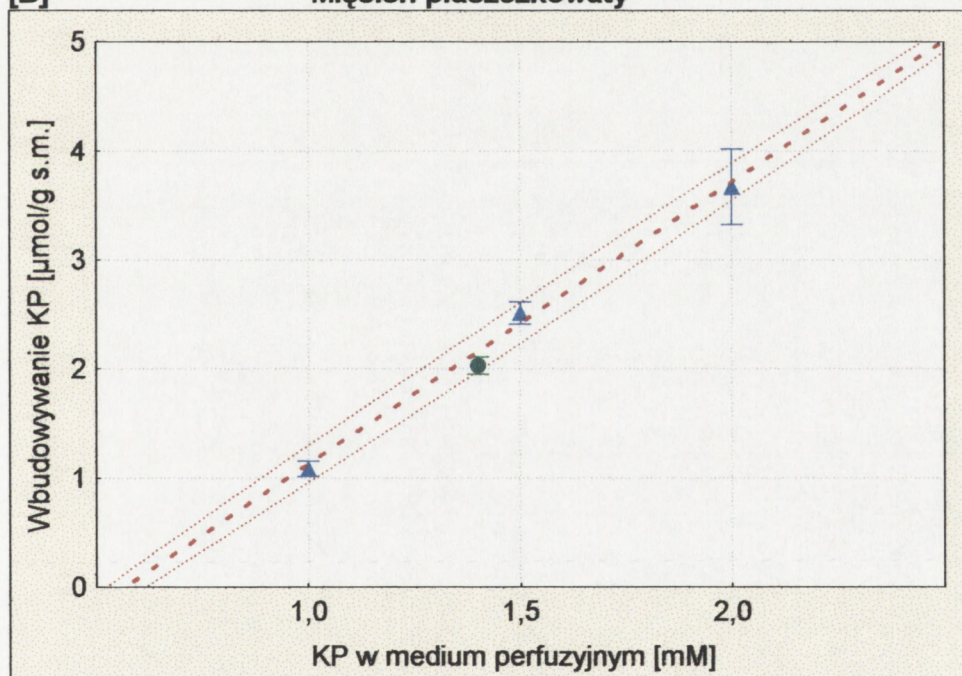
Wykazano, że pod wpływem 12 godzinnej ekspozycji na niską temperaturę otoczenia (6°C) stężenie kwasów tłuszczowych w surowicy krwi szczurów podwyższyło się istotnie ( $p < 0,01$ ) do  $0,387 \pm 0,024$  mM ( $n=6$ ) w porównaniu ze stężeniem  $0,249 \pm 0,027$  mM ( $n=6$ ) stwierdzonym u zwierząt przebywających w temperaturze neutralnej. Ekspozycja na zimno nie miała wpływu na zawartość glikogenu w wątrobie, która wynosiła  $303 \pm 19$   $\mu\text{mol} / \text{g m.m.}$  ( $n=6$ ) wobec  $304 \pm 13$   $\mu\text{mol} / \text{g m.m.}$  ( $n=6$ ) u szczurów nie poddanych działaniu zimna. O zwiększonym wykorzystaniu kwasów tłuszczowych jako źródła energii przez szczury poddane ekspozycji na niską temperaturę otoczenia przez 12h w 6°C świadczy także stwierdzenie w innych badaniach naszego Zakładu obniżenia o połowę stężenia triacylogliceroli we krwi oraz zwiększenia aktywności lipazy lipoproteinowej (LPL) w mięśniach szkieletowych (wyniki niepublikowane).

W żadnym z badanych mięśni nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między wbudowywaniem KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe (mono-, di- oraz triacyloglicerole) u zwierząt poddanych 12h ekspozycji na zimno i perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 4% albuminy oraz 1,4 mM kwasu palmitynowego, a wartościami wbudowywania KP w acyloglicerole obliczonymi dla 1,4 mM KP u szczurów przebywających w temperaturze neutralnej (Tab. 6). W czerwonej części mięśnia czworogłowego uda wbudowywanie KP (Ryc. 9A) wyniosło  $1,99 \pm 0,17$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ), w mięśniu płaszczkowatym (Ryc. 9B)  $2,03 \pm 0,08$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ), natomiast w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 10A)  $1,64 \pm 0,12$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ). W mięśniu podeszwowym (Ryc. 10B) wbudowywanie KP wyniosło  $1,13 \pm 0,06$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ). Najmniej KP zostało wbudowane w mięśnie szybko kurczące glikolityczne: białą część mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 11A) oraz białą część mięśnia czworogłowego uda (Ryc. 11B). Wbudowywanie KP w acyloglicerole w tych mięśniach wyniosło  $0,60 \pm 0,04$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ) i  $0,69 \pm 0,07$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ).

[A] Czerwona część mięśnia czworogłowego uda

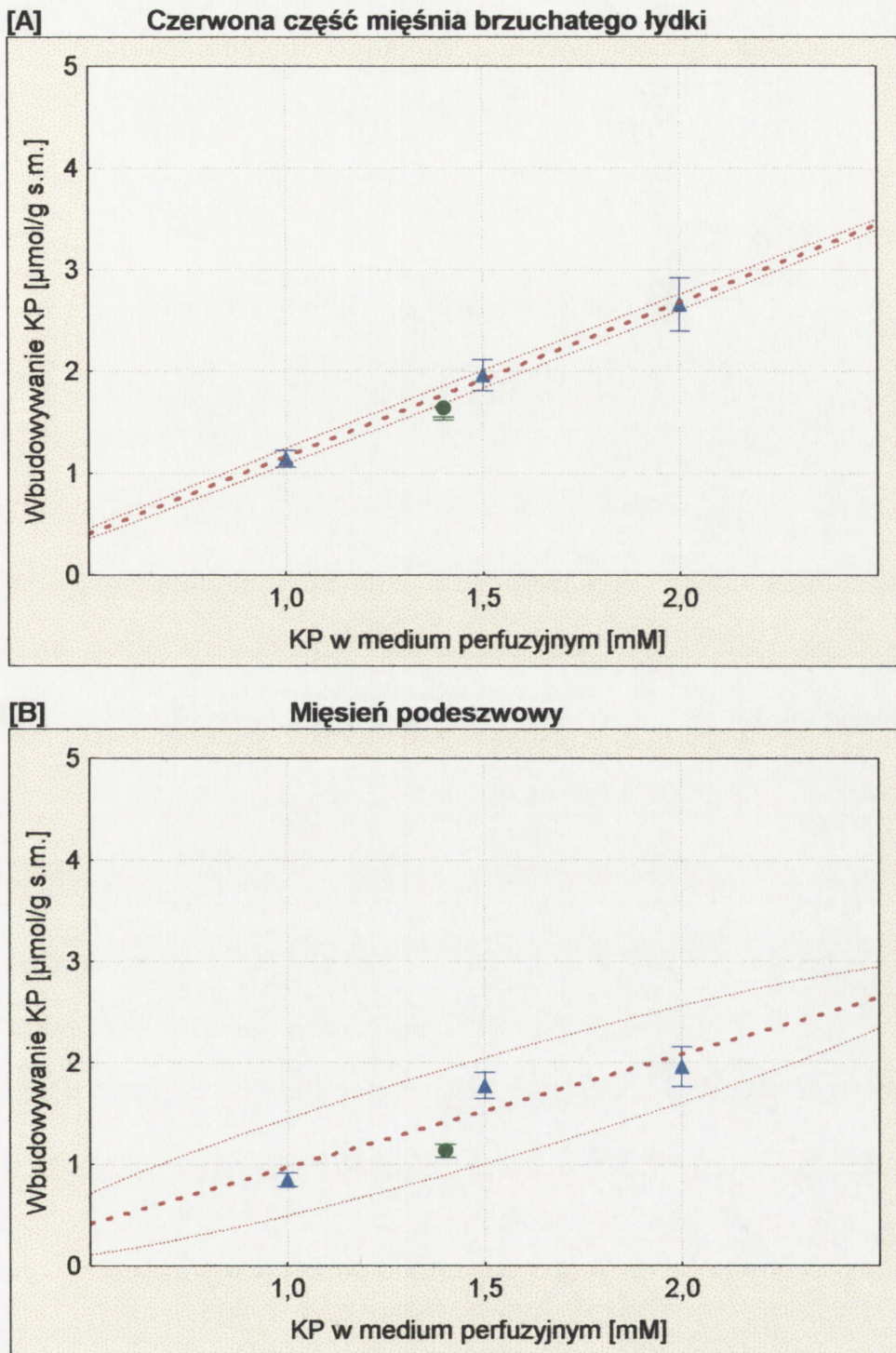


[B] Mięsień płaszczkowy



Ryc. 9

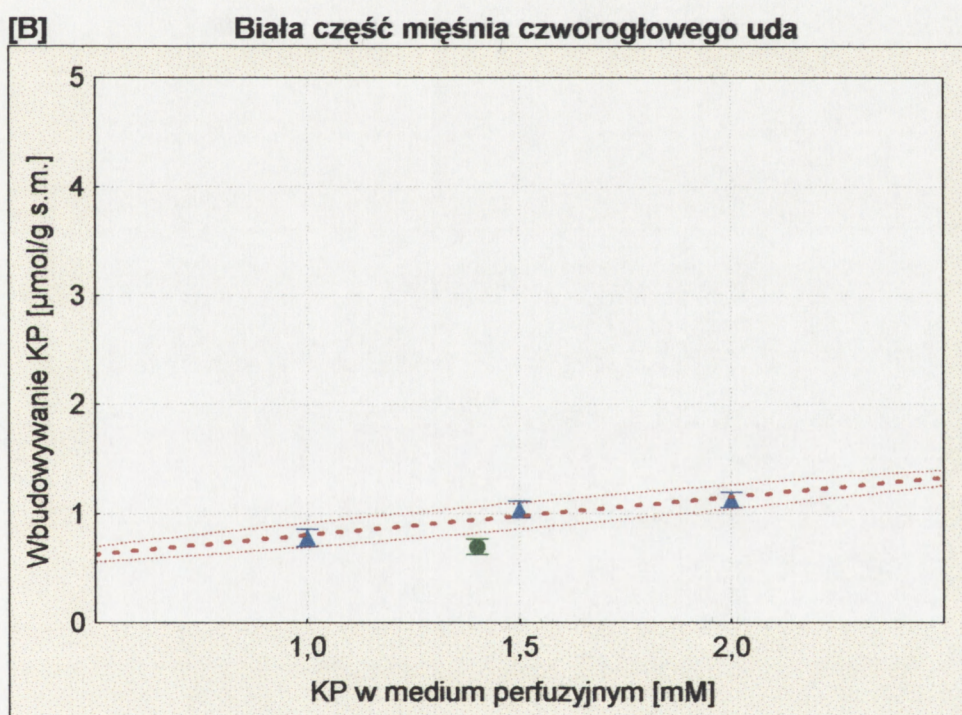
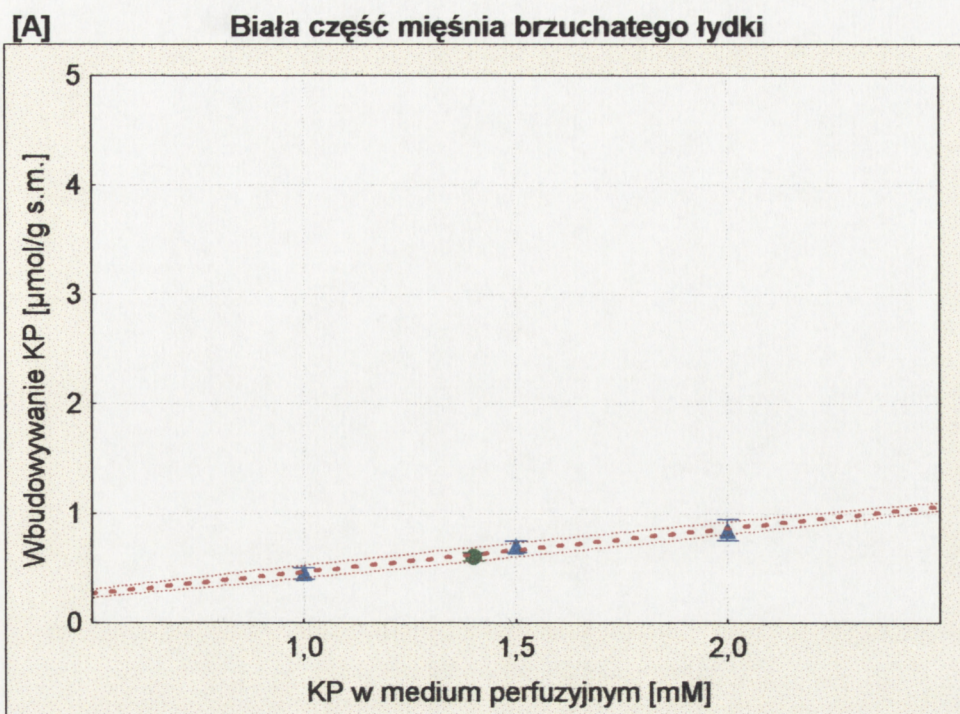
Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów poddanych ekspozycji na niską temperaturę otoczenia 6°C przez 12h (●) i następnie perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 1,4 mM KP oraz 4% albuminy. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy. Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów przebywających w temperaturze neutralnej i perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 lub 1,5 lub 2,0 mM KP. Linia kropkowaną zaznaczono elipsę obszaru ufności średniej (p < 0,05).



**Ryc. 10**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów poddanych ekspozycji na niską temperaturę otoczenia 6°C przez 12h (●) i następnie perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 1,4 mM KP oraz 4% albuminy. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów przebywających w temperaturze neutralnej i perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 lub 1,5 lub 2,0 mM KP. Linia kropkowaną zaznaczono elipsę obszaru ufności średniej ( $p < 0,05$ ).





**Ryc. 11**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów poddanych ekspozycji na niską temperaturę otoczenia 6°C przez 12h (●) i następnie perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 1,4 mM KP oraz 4% albuminy. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy. Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów przebywających w temperaturze neutralnej i perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 lub 1,5 lub 2,0 mM KP. Linia kropkowaną zaznaczono elipsę obszaru ufności średniej ( $p < 0,05$ ).

Tab. 6.

Porównanie wbudowywania kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów ekspozowanych na niską temperaturę otoczenia (6°C, 12 godz.), a następnie perfundowanych 1,4 mM KP (4% albuminy) z obliczonymi wartościami wbudowywania przy 1,4 mM KP u szczurów kontrolnych. Czas perfuzji 30 min.

MIĘSIEŃ	Kontrola (1,4 mM KP)	Ekspozycja na zimno
Czerwona część mięśnia czworogłowego uda	2,49 ± 0,20	1,99 ± 0,17
Mięsień płaszczkowaty	2,19 ± 0,17	2,03 ± 0,08
Czerwona część mięśnia brzuchatego łydki	1,73 ± 0,55	1,64 ± 0,43
Mięsień podeszwowy	1,39 ± 0,14	1,13 ± 0,06
Biała część mięśnia brzuchatego łydki	0,62 ± 0,08	0,60 ± 0,04
Biała część mięśnia czworogłowego uda	0,93 ± 0,11	0,69 ± 0,07

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy w  $\mu\text{mol}$  kwasu palmitynowego / g suchej masy.

W żadnym z badanych mięśni nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między wbudowywaniem KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u zwierząt poddanych 12h ekspozycji na zimno, a wartościami kontrolnymi.

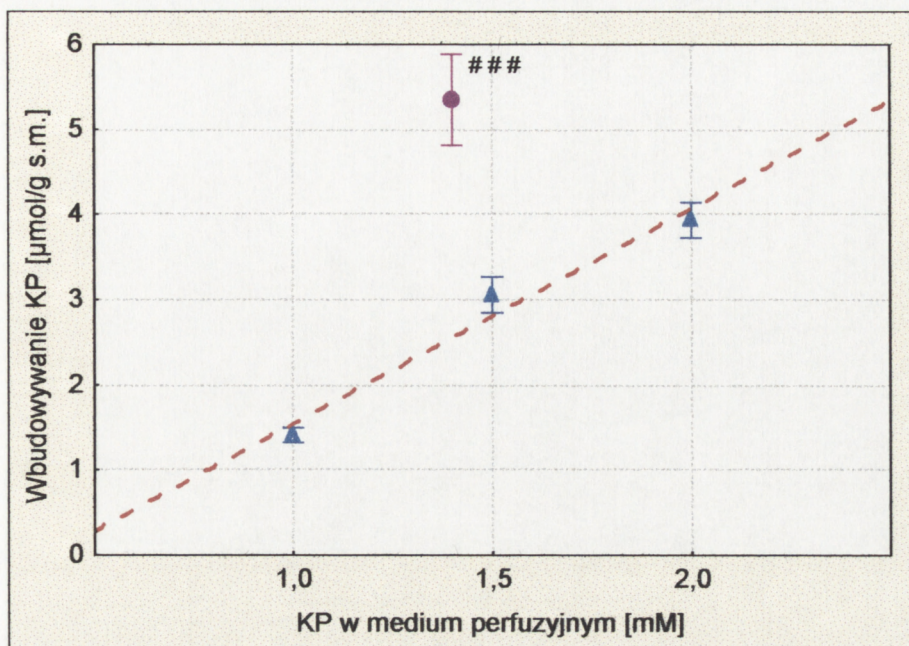
### Szczury poddane 48 godzinnemu głodzeniu

Stwierdzono, że w wyniku 48 godzinnego głodzenia masa ciała zwierząt zmniejszyła się o  $12,7\% \pm 0,9\%$  ( $n=6$ ) i wynosiła około 185-195g. Stężenie kwasów tłuszczowych we krwi szczurów głodzonych podwyższyło się istotnie ( $p<0,01$ ) do  $0,476 \pm 0,045$  mM ( $n=5$ ) w porównaniu z  $0,249 \pm 0,027$  mM ( $n=6$ ) u szczurów nie głodzonych. Towarzyszyło temu znaczne (o 85%) zmniejszenie zawartości glikogenu w wątrobie z  $304 \pm 13$   $\mu\text{mol} / \text{g m.m.}$  ( $n=6$ ) u zwierząt kontrolnych do  $45 \pm 12$   $\mu\text{mol} / \text{g m.m.}$  ( $n=6$ ) u szczurów głodzonych.

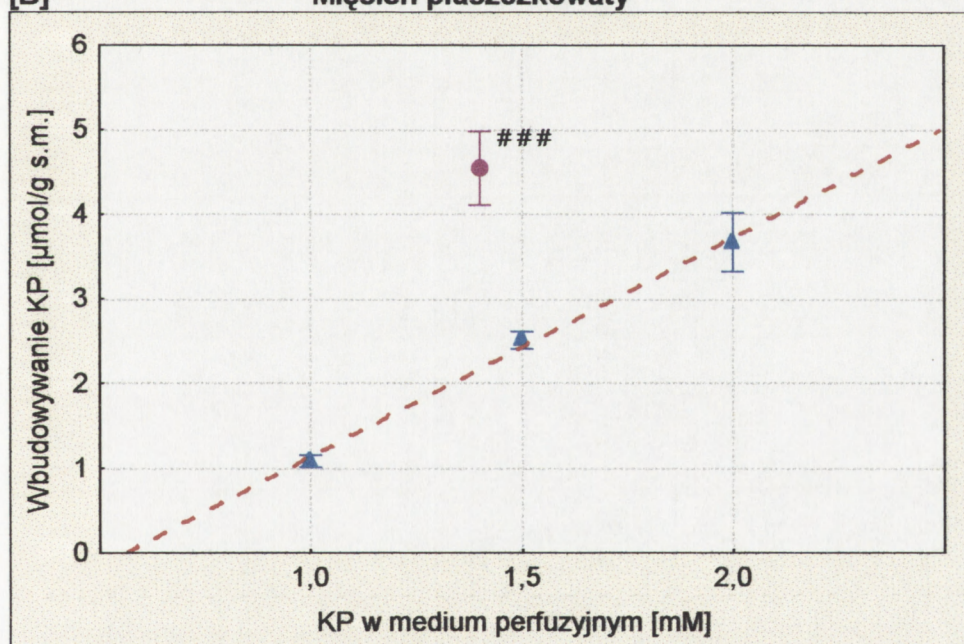
Wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe (mono-, di- oraz triacyloglicerole) perfundowanych kończyn tylnych (30 min., 4% albuminy, 1,4 mM KP) u zwierząt poddanych 48h głodzeniu zwiększało się istotnie statystycznie we wszystkich badanych mięśniach w porównaniu z wartościami stwierdzonymi u zwierząt nie głodzonych. W czerwonej części mięśnia czworogłowego uda (Ryc. 12A) wbudowywanie KP było największe ( $5,35 \pm 0,54$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$ ,  $n=12$ ). W mięśniu płaszczkowatym (Ryc. 12B) nieco mniej KP zostało wbudowane w acyloglicerole ( $4,54 \pm 0,44$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$ ,  $n=12$ ), podobnie jak w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 13A) ( $4,82 \pm 0,52$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$ ,  $n=12$ ). W mieszanym mięśniu podeszwowym (Ryc. 13B) wbudowywanie KP było jeszcze niższe i wynosiło  $3,28 \pm 0,24$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ). Najniższe wartości wbudowywania stwierdzono w białej części mięśnia brzuchatego łydki (Ryc. 14A) oraz białej części mięśnia czworogłowego uda (Ryc. 14B). Wynosiły ono odpowiednio  $1,60 \pm 0,11$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ) oraz  $1,70 \pm 0,16$   $\mu\text{mol} / \text{g s.m.}$  ( $n=12$ ).

Podsumowując: u szczurów poddanych 48 godz. głodzeniu i następnie perfundowanych medium zawierającym 1,4 mM kwasu palmitynowego przy 4% albuminy wołowej wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe było istotnie większe we wszystkich badanych typach mięśni niż u szczurów kontrolnych perfundowanych medium zawierającym 1,5 mM KP oraz 4% albuminy. Poziom istotności zaznaczony jest na odpowiednich rysunkach.

**[A]** Czerwona część mięśnia czworogłowego uda



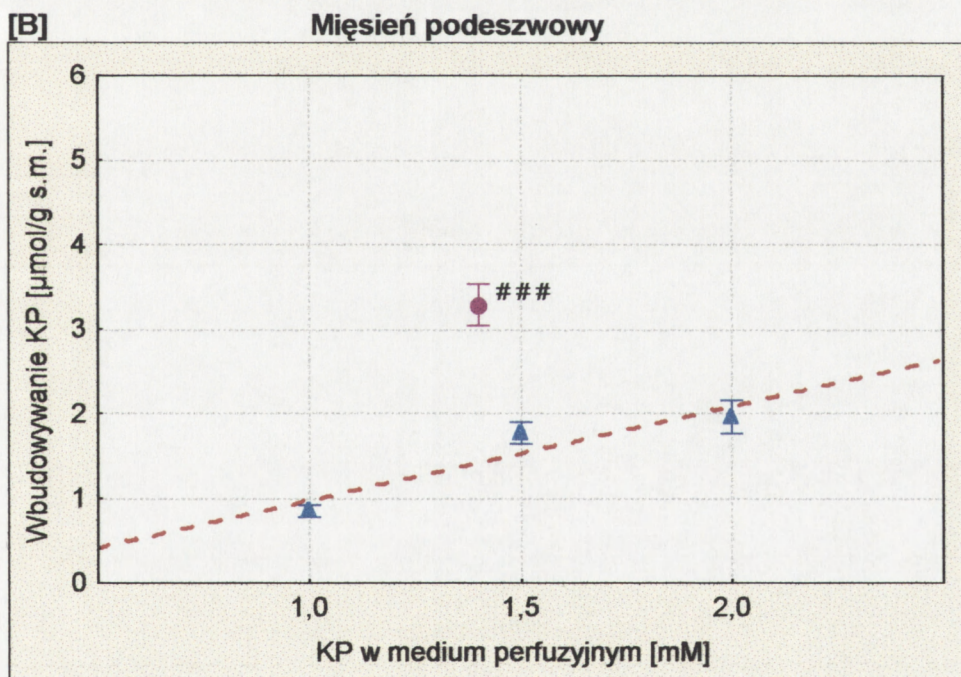
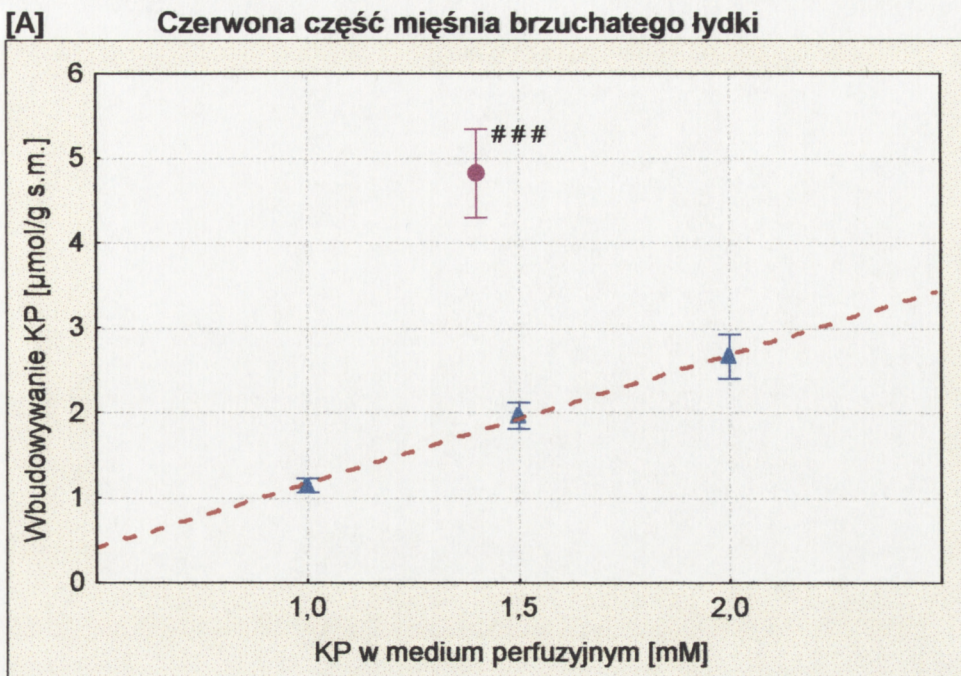
**[B]** Mięsień płaszczkowy



**Ryc. 12**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów głodzonych przez 48h (●) i następnie perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 1,4 mM KP oraz 4% albuminy. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów nie głodzonych perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 lub 1,5 lub 2,0 mM KP.

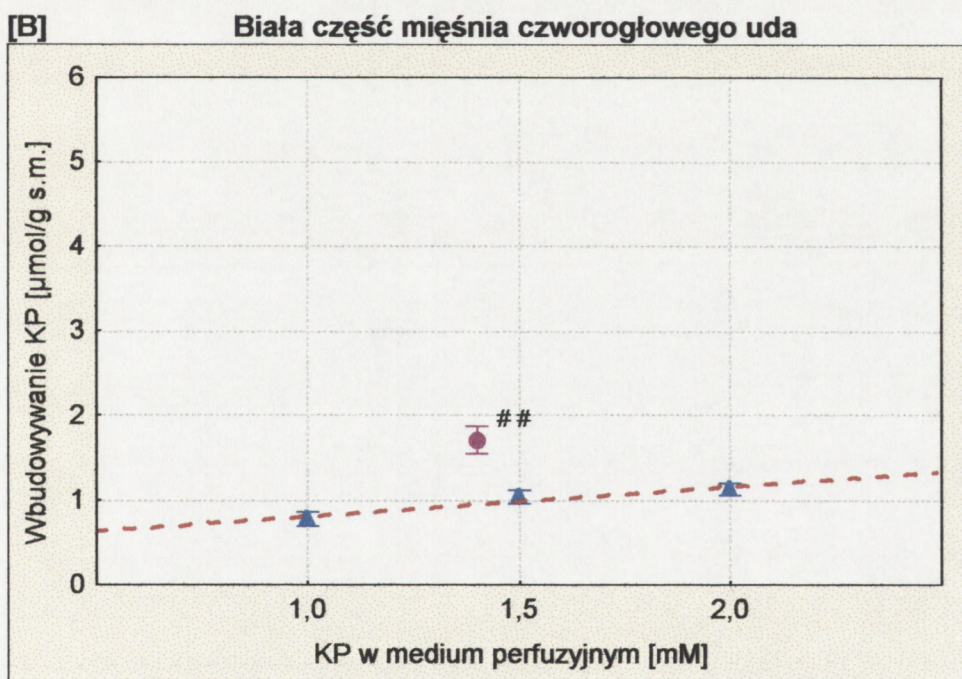
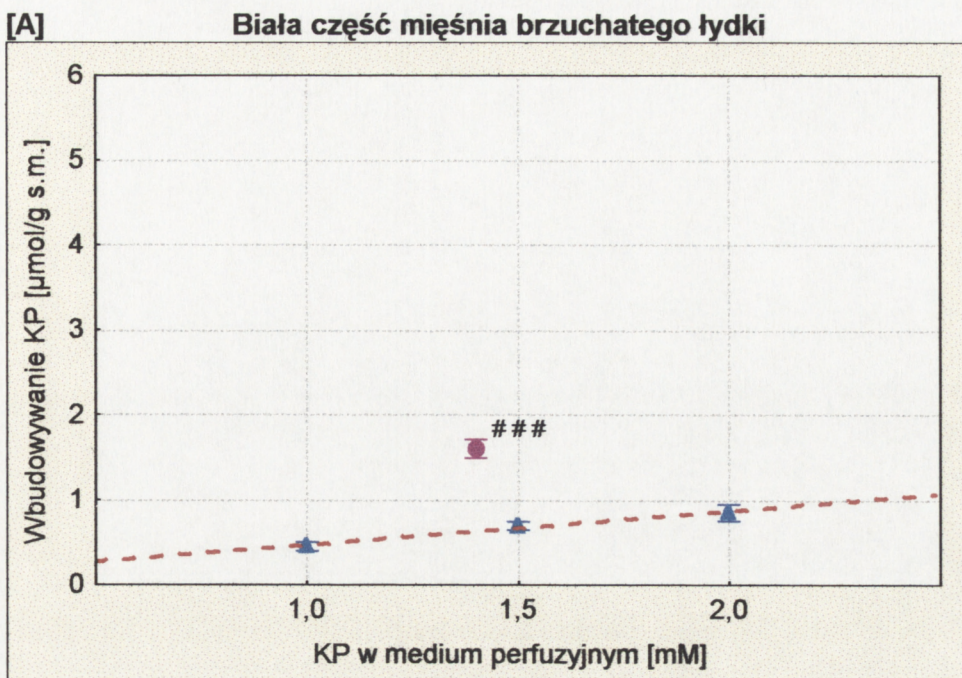
(#) Oznacza różnicę istotną statystycznie (###:  $p < 0,001$ ) pomiędzy uzyskaną wartością i wbudowywaniem w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów nie głodzonych przy 1,5 mM KP.



**Ryc. 13**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów głodzonych przez 48h (●) i następnie perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 1,4 mM KP oraz 4% albuminy. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± błąd standardowy. Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów nie głodzonych perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 lub 1,5 lub 2,0 mM KP.

(#) Oznacza różnicę istotną statystycznie (###:  $p < 0,001$ ) pomiędzy uzyskaną wartością i wbudowywaniem w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów nie głodzonych przy 1,5 mM KP.



**Ryc. 14**

Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów głodzonych przez 48h (●) i następnie perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 1,4 mM KP oraz 4% albuminy. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  błąd standardowy. Dla porównania na rycinie zaznaczono (trójkąty, linia przerywana) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów nie głodzonych perfundowanych przez 30 min. medium zawierającym 4% albuminy i 1,0 lub 1,5 lub 2,0 mM KP.

(#) Oznacza różnicę istotną statystycznie (##:  $p < 0,01$ , ###:  $p < 0,001$ ) pomiędzy uzyskaną wartością i wbudowywaniem w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów nie głodzonych przy 1,5 mM KP.

## 6. Dyskusja

Technika perfuzji kończyn tylnych szczura opisana we wczesnych latach 70-tych przez Rudermana i wsp. (1971) znalazła szerokie zastosowanie w badaniach nad metabolizmem glukozy, glikogenu, triacylogliceroli i ketokwasów w mięśniach szkieletowych w wielu stanach fizjologicznych (Górski i wsp., 1986). Stanowi ona także bardzo dobre narzędzie do badań nad metabolizmem kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych. Część badaczy prowadziła perfuzję przy użyciu medium bazującym na buforze węglanowym Krebsa-Henseleita zawierającym erytrocyty wołowe (Górski i wsp., 1986), którego przygotowanie wymagało kosztownej i pracochłonnej procedury (Bonen i wsp., 1994). Okazało się jednak, że zastosowanie medium perfuzyjnego nie zawierającego erytrocytów również pozwala na przeprowadzenie prawidłowej perfuzji (Budohoski i wsp., 1996). W porównaniu z techniką *in vitro* mięśnia inkubowanego, *in situ* perfuzja kończyn tylnych oferuje szereg korzyści (patrz: Bonen i wsp., 1994) z których najważniejszą wydaje się być możliwość dostarczenia medium perfuzyjnego do mięśni bezpośrednio poprzez naczynia układu krwionośnego zwierzęcia. Umożliwia to także jednoczesne stosunkowo łatwe badanie mięśni o różnym składzie włókien. Perfuzja kończyn tylnych szczura w temperaturze 37°C zapewnia, podobnie jak inkubacja *in vitro* (Górecka i wsp., 2001), utrzymanie prawidłowego funkcjonowania mięśni szkieletowych przynajmniej przez kilka godzin doświadczenia, co potwierdza fakt, że zawartość wewnątrzkomórkowego adenozynotrifosforanu i fosfokreatyny utrzymuje się w tym czasie na niezmiennym poziomie (Bonen i wsp., 1994). Wychwył kwasów tłuszczowych w dość szerokim zakresie nie zależy od tempa perfuzji co ułatwia porównywanie wyników uzyskanych przez różne grupy badaczy. Budohoski i wsp. (1996) stwierdzili, że wbudowywanie kwasów tłuszczowych w triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe pozostaje na zbliżonym poziomie gdy przepływ medium perfuzyjnego wynosi 20, 34 bądź 50 ml/min. Z kolei Turcotte i wsp. (1998) wykazali, że wychwył kwasów tłuszczowych, określony na podstawie pomiaru różnicy tętniczo-żylny, nie zmienia się gdy perfuzję prowadzono z w tempie 9 lub 15 ml/min. Świadczy to, że w wyżej wymienionym zakresie wychwył kwasów tłuszczowych jest na tyle powolny, że zwiększenie dostawy KT przez zwiększenie tempa

perfuzji nie ma na niego wpływu. Inaczej dzieje się z glukozą w przypadku której stwierdzono (Turcotte i wsp., 1998), że jej wychwyty przy przepływie 15ml/min był o 38% wyższy niż przy 9 ml/min. Istotną wadą techniki perfuzji w porównaniu z metodą inkubacji *in vitro* jest brak możliwości zbadania utleniania kwasów tłuszczowych przez poszczególne grupy mięśni. Zastosowanie do perfuzji znakowanego trytem kwasu tłuszczowego i pomiar w perfuzacji ilości wody w którą wbudowany został tryt pozwala jedynie na określenie sumarycznego utleniania KT przez wszystkie tkanki kończyn tylnych łącznie z tkanką tłuszczową. Aby sprawdzić czy zaadaptowana w naszej Pracowni technika perfuzji kończyn tylnych szczura funkcjonuje prawidłowo i czy uzyskane zależności są zgodne z opisanymi przez innych badaczy przed przystąpieniem do właściwych doświadczeń oceniono wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w zależności od czasu trwania perfuzji.

#### **Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w zależności od czasu trwania perfuzji**

Liniową zależność wychwyty kwasów tłuszczowych przez komórki od czasu trwania inkubacji bądź perfuzji stwierdzono w licznych doniesieniach. DeGrella i Light (1980) stwierdzili, że wbudowywanie kwasu oleinowego w triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe wzrasta liniowo wraz z czasem trwania inkubacji w izolowanych kardiomiocytach szczura. Z kolei Glatz i Veerkamp (1982) wykazali liniową zależność utleniania kwasu palmitynowego przez mięsień przepony szczura w ciągu pierwszych 90 minut inkubacji. Liniową zależność pomiędzy czasem trwania doświadczenia, a wbudowywaniem KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe odnotowano również w tlenowych i glikolitycznych mięśniach szkieletowych szczura przy użyciu techniki inkubacji *in vitro* (Dyck i wsp., 1997) oraz perfuzji kończyn tylnych *in situ* (Budohoski i wsp., 1996). Badania obecnej pracy w pełni potwierdzają te dane.

Co więcej, przeprowadzone badania własne pozwoliły także potwierdzić różnice we wbudowywaniu KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe pomiędzy mięśniami różniącymi się składem włókien stwierdzane uprzednio przez innych autorów, którzy



opisali w warunkach *in vitro*, *in situ* jak i *in vivo* większe wbudowywanie kwasów tłuszczowych w lipidy wewnątrzkomórkowe mięśni szkieletowych o przewodze włókien tlenowych w porównaniu do mięśni zawierających głównie włókna glikolityczne. Przy użyciu techniki inkubacji *in vitro* Dyck i wsp. (1997) wykazali, że wbudowywanie kwasu palmitynowego w triacyloglicerole mięśnia płaszczkowatego szczura o przewodze włókien tlenowych jest około dwukrotnie większe niż w glikolitycznym mięśniu nadbłoczkowym. Stosując technikę inkubacji Okano and Shimojo (1982) stwierdzili, że wbudowywanie kwasu palmitynowego w triacyloglicerole czerwonej części mięśnia czworogłowego uda jest o 40% większe niż w białej części tego mięśnia. Z kolei Budohoski i wsp. (1996) stosując *in situ* system perfuzji kończyn tylnych szczura, bardzo podobny do użytego w obecnej pracy, wykazali, że wbudowywanie kwasu palmitynowego w triacyloglicerole mięśnia płaszczkowatego oraz czerwonych części mięśnia brzuchatego łydki oraz czworogłowego uda jest około 4-krotnie większe niż w białej części mięśnia brzuchatego łydki i czworogłowego uda. Górski i Bonen (1997), którzy podawali szczurom kwas palmitynowy bezpośrednio do krwi stwierdzili natomiast, że jego wbudowywanie w TG w warunkach *in vivo* w mięśniu płaszczkowatym oraz w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki jest dwukrotnie większe niż w białej części mięśnia brzuchatego łydki. Poddanie mięśni stymulacji elektrycznej powoduje, że różnica we wbudowywaniu kwasów tłuszczowych w TG mięśni o przewodze włókien tlenowych i przewodze włókien glikolitycznych jeszcze się powiększa (Górski i Bonen, 1997).

Jak wspomniano wyżej wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdziły, że wbudowywanie KP w acyloglicerole mięśnia płaszczkowatego, czerwonych części mięśnia brzuchatego łydki oraz czworogłowego uda jest około dwu- / trzykrotnie większe niż wbudowywanie w białe części mięśnia brzuchatego łydki i czworogłowego uda. Wyniki te są zgodne z oczekiwaniami również dlatego, że, jak opisano szerzej we Wstępie, błony komórkowe włókien tlenowych zawierają więcej białek FABPpm, FAT i FATP, które według współczesnych poglądów wspomagają wychwytywanie kwasów tłuszczowych. Włókna te posiadają więc większą zdolność do wychwytywania KT z osocza niż włókna glikolityczne. W porównaniu do włókien glikolitycznych włókna tlenowe w znacznie większym stopniu

wykorzystują kwasy tłuszczowe jako substraty energetyczne w związku z czym zawierają większą ilość mitochondriów i cechują się wyższą aktywnością enzymów uczestniczących w utlenianiu KT (patrz: Kozłowski i wsp., 1999). Większa ilość tlenu na potrzeby  $\beta$ -oksydacji zapewniona jest przez gęstsza sieć naczyń krwionośnych dochodząca do tych włókien oraz większą zawartość mioglobiny, białka będącego wewnątrzkomórkowym „magazynem” tlenu. Także zawartość triacylogliceroli wewnątrzkomórkowych jest większa we włóknach tlenowych (patrz: Kozłowski i wsp., 1999).

*Względne wbudowywanie kwasu palmitynowego w lipidy wewnątrzmięśniowe w zależności od czasu trwania perfuzji wyrażone w procentach*

W badaniach obecnej pracy stwierdzono, że względne, wyrażone w procentach, wbudowywanie KP w lipidy wewnątrzmięśniowe nie zależy, przynajmniej u szczura, od czasu trwania perfuzji w ciągu 30-60 min. Jest to wynik wskazujący na to, że przy zastosowanym systemie procesy syntezy acylogliceroli i fosfolipidów przebiegają równomiernie. Gdyby wbudowywanie KP w lipidy wewnątrzmięśniowe podlegało fluktuacjom wykluczałoby to użycie tego modelu w dalszych badaniach.

Co więcej wyniki obecnych badań wskazują, że w mięśniach o przewodze włókien tlenowych KP wbudowywany jest głównie w pulę triacylogliceroli (w przybliżeniu 70%), około 15-25% KP w pulę DG/MG, natomiast w fosfolipidy wbudowywane jest poniżej 10% KP. Za 100% przyjęto sumę wbudowywania w TG, DG/MG i PL. Podobnie małe wbudowywanie kwasu oleinowego w fosfolipidy wewnątrzkomórkowe opisali DeGrella i Licht (1980) we włóknach kardiomiocytów szczura izolowanych przy pomocy kolagenazy i inkubowanych w 37°C. Wbudowywanie kwasu oleinowego w triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe było w tych warunkach około 6-krotnie wyższe niż w fosfolipidy po 30 min. inkubacji, a 9-krotnie wyższe po 60 min. Również Reimer i wsp. (1975), perfundując kończyny tylne szczura medium zawierającym znakowany węglem <sup>14</sup>C kwas oleinowy, glukozę oraz insulinę, stwierdzili, że ponad 80% tego kwasu wbudowywane jest w triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe. Nie jest jednak jasne dlaczego autorzy ci nie

stwierdzili wbudowywania kwasu oleinowego w mono- i diacyloglicerole. Większość danych piśmiennictwa wskazuje jednak na nieco niższe od stwierdzonych w obecnej pracy względne wartości wbudowywania KT w TG, a wyższe w fosfolipidy wewnątrzmięśniowe, chociaż w doniesieniach tych istnieją pewne rozbieżności. W badaniach prowadzonych równolegle w naszym Zakładzie, z zastosowaniem techniki inkubacji *in vitro* mięśnia płaszczkowatego (Górecka i wsp., 2001), stwierdzono, że wbudowywanie KP w fosfolipidy wewnątrzmięśniowe jest znacznie wyższe (19-26%) od uzyskanego w obecnej pracy, natomiast wbudowywanie w DG/MG wyniosło tylko 7-12%. Z kolei Górski i Bonen (1997) stwierdzili, że w mięśniu płaszczkowatym oraz czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki szczurów poddanych infuzji kwasu palmitynowego, kwas ten wbudowywany był w około 52-54% w TG, 13-15% w DG/MG, natomiast aż w 32% w PL. Nieco odmienne wyniki zaprezentowano w innych pracach tej grupy badaczy. Na przykład, w pracy Dycka i Bonena (1998) stwierdzono, że inkubowanym mięśniu płaszczkowatym KP wbudowywany jest w około 67% w TG, 20% w DG/MG i tylko w 14% w PL, natomiast w pracy Dycka i wsp. (1997) stwierdzono, że wbudowywanie to wynosi 65% w TG, 13% w DG/MG i 22% w PL (Dyck i wsp., 1997).

W obecnej pracy stwierdzono, że w mięśniach o przewodze włókien glikolitycznych (białej części mięśnia brzuchatego łydki oraz białej części mięśnia czworogłowego uda) względne wbudowywanie KP w TG wewnątrzmięśniowe jest mniejsze niż w mięśniach o przewodze włókien tlenowych (mięśniu płaszczkowatym, czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki oraz czerwonej części mięśnia czworogłowego uda), natomiast wbudowywanie w DG/MG jest większe. Podobną zależność opisali Górski i Bonen (1997) w białej i czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki u szczura poddanego infuzji znakowanym kwasem palmitynowym. Także w inkubowanym mięśniu nadbłoczkowym (glikolitycznym) szczura opisano większe względne wbudowywanie KP w DG/MG niż w mięśniu płaszczkowatym (Dyck i wsp., 1997). Może się to wiązać z mniejszą zawartością FAT w błonach komórkowych mięśni składających się w przewodzie z włókien glikolitycznych w porównaniu do mięśni składających się w przewodzie z włókien tlenowych bądź tlenowo-glikolitycznych (Bonen i wsp., 1998b). Opisano bowiem, że w

szczepie myszy nie posiadających genu kodującego FAT wychwyty kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe jest znacznie mniejszy niż u myszy kontrolnych oraz, że zmniejszone zostaje wbudowywanie kwasów tłuszczowych w TG wewnątrzmięśniowe, natomiast wzrasta akumulacja KT w diacyloglicerolach wewnątrzmięśniowych (Coburn i wsp., 2000). Autorzy ci zbadali także aktywność acylotransferazy diacyloglicerolowej odpowiedzialnej za syntezę TG z DG oraz syntetazy acylo-CoA, które, jak się okazało, nie odbiegały od wartości kontrolnych, stwierdzili natomiast zmniejszenie wewnątrzkomórkowej zawartości acylo-CoA będące najprawdopodobniej wynikiem zmniejszonego wychwyty KT. Coburn i wsp. (2000) sugerują, że zahamowanie syntezy TG na etapie DG umożliwia optymalizację gospodarki wewnątrzmięśniowymi KT w warunkach ich zmniejszonej dostępności. Pozwala bowiem zaoszczędzić KT dla  $\beta$ -oksydacji oraz zapewnić prekursor dla syntezy fosfolipidów. Z tym ostatnim stwierdzeniem trudno się jednak zgodzić, gdyż prekursorem fosfolipidów w głównym szlaku ich syntezy jest kwas fosfatydowy. Hydroliza kwasu fosfatydowego (Ryc. 2) prowadzi do powstania DG, z którego z kolei syntezowane są triacyloglicerole.

**Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy rosnącym całkowitym stężeniu kwasów palmitynowego i rosnącym stężeniu niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym**

Liniową zależność pomiędzy wychwytem kwasów tłuszczowych, a ich całkowitym stężeniem w osoczu stwierdzono już we wczesnych latach 60-tych u człowieka (patrz: Van der Vusse i Reneman 1996). Analogiczny, ponad dwukrotny wzrost wychwyty kwasu  $[1-^{14}\text{C}]$ -oleinowego przez mięśnie szkieletowe szczura wraz ze wzrostem całkowitego stężenia tego kwasu od 0,6 do 1,8 mM (stężenie albuminy 4%) opisali Reimer i wsp. (1975) stosując technikę perfuzji kończyn tylnych szczura, przy czym, przy całkowitym stężeniu 1,0 mM kwasu oleinowego tempo jego wychwyty wynosiło około  $160 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$ , natomiast przy 1,5 mM około  $220 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$ . Stwierdzono również, że tempo wbudowywania kwasu oleinowego w triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe

wzrasta liniowo wraz z jego całkowitym stężeniem w medium perfuzyjnym i wynosi około  $70 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$  przy stężeniu  $1,0 \text{ mM}$ , a około  $100 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$  przy stężeniu  $1,5 \text{ mM}$  kwasu oleinowego. Niestety nie podano, którego mięśnia dane te dotyczą. Turcotte i wsp. (1991) zbadali tempo wychwytu kwasu  $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitynowego stosując model perfundowanej kończyny tylnej szczura i medium zawierające zmienne całkowite stężenie KP oraz stałe stężenie albuminy (5%). Na podstawie pomiaru różnicy tętniczo-żylnej autorzy ci wykazali, że tempo wychwytu KP wzrasta liniowo wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP, oraz że przy stężeniu całkowitym KP w medium perfuzyjnym  $1,0 \text{ mM}$ ,  $1,5 \text{ mM}$  oraz  $2,0 \text{ mM}$  KP wynosi ono odpowiednio około  $40$ ,  $60$  i  $80 \text{ nM} \times \text{min.}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$ . Dalej posunęli się w swoich badaniach Budohoski i wsp. (1996), którzy przy użyciu techniki perfuzji kończyn tylnych szczura medium zawierającym 5% albuminy zbadali tempo wbudowywania kwasu  $[9,10-^3\text{H}]$ -palmitynowego w acyloglicerole w mięśniach szkieletowych o różnym składzie włókien. Również i ci autorzy stwierdzili, że wbudowywanie KP wzrasta liniowo wraz z całkowitym stężeniem KP w medium perfuzyjnym. Największe wbudowywanie odnotowano w mięśniu płaszczkowatym, czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki i czerwonej części mięśnia czworogłowego uda, które wynosiło odpowiednio około  $330$ ,  $510$  oraz  $700 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$  przy całkowitym stężeniu KP  $1,0$ ,  $1,5$  i  $2,0 \text{ mM}$ . Mniejsze wbudowywanie autorzy cytowanej pracy stwierdzili w mięśniu podeszwowym, natomiast najmniejsze w białej części mięśnia brzuchatego łydki oraz białej części mięśnia czworogłowego uda. Liniową zależność wbudowywania kwasu palmitynowego od całkowitego stężenia tego kwasu wykazano także w inkubowanym mięśniu płaszczkowatym oraz nadbłoczkowym (Dyck i wsp., 1997). Tempo wbudowywania KP w triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy stężeniu  $1 \text{ mM}$  KP i 4% albuminy w medium inkubacyjnym wynosiło około  $6 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$  w mięśniu płaszczkowatym i około  $4 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$  w mięśniu nadbłoczkowym. W późniejszej pracy tej samej grupy, również przy użyciu techniki inkubacji, zmierzone tempo wbudowywania KP w triacyloglicerole mięśnia płaszczkowatego gdy medium inkubacyjne zawierało 4% albuminy oraz  $1 \text{ mM}$  KP było podobnego rzędu i wynosiło około  $9 \text{ nM} \times \text{min}^{-1} \times \text{g s.m.}^{-1}$  (Dyck i wsp., 2000).

Wyniki badań własnych przedstawionych w obecnej pracy wskazują, iż wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w wartościach bezwzględnych jest tego samego rzędu wielkości co opisane przez Reimera i wsp. (1975) oraz Turcotte i wsp. (1991), natomiast niższe od wartości uzyskanych przez Budohoskiego i wsp. (1996). Być może rozbieżności te związane są ze szczepem szczurów na których prowadzono perfuzję, gdyż zarówno w niniejszej pracy jak i w pracy Reimera i wsp. (1975) oraz Turcotte i wsp. (1991) do doświadczeń użyto szczury szczepu Wistar, natomiast Budohoski i wsp. (1996) używali szczurów szczepu Sprague-Dawley. Należy zaznaczyć, że wbudowywanie KP mierzone przy zastosowaniu techniki *in situ* jest większe niż wbudowanie KT stwierdzone przy użyciu metody *in vitro*. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że w porównaniu z techniką perfuzji, podczas której KT dostarczane są bezpośrednio do włókien mięśniowych przez naczynia krwionośne, przy użyciu techniki inkubacji „dostawa” KT może być ograniczana szybkością dyfuzji kompleksu albumina-KT.

Podobnie jak w badaniach Budohoskiego i wsp. (1996) również w obecnej pracy stwierdzono, że wyrażone w wartościach bezwzględnych wbudowywanie KP w acyloglicerole mięśni o przewodze włókien tlenowych wzrasta znacznie szybciej wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP w medium perfuzyjnym niż w mięśniach glikolitycznych. Jednakże, w przeciwieństwie do badań Budohoskiego i wsp. (1996), którzy wykazali, że wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe mięśnia płaszczkowatego oraz czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki wzrasta praktycznie identycznie, w obecnych badaniach stwierdzono, że wbudowywanie to wzrasta najszybciej w czerwonej części mięśnia czworogłowego uda, następnie w mięśniu płaszczkowatym i kolejno w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki, mięśniu podeszwowym oraz białych częściach mięśnia czworogłowego uda i brzuchatego łydki. Podobnie Górski i Bonen (1997) stwierdzili, że wbudowywanie KP do mięśnia płaszczkowatego jest większe niż wbudowywanie do czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki.

Zgodnie z koncepcją Turcotte i wsp. (1991) właściwszym jest odnoszenie uzyskanych danych doświadczalnych dotyczących wychwytu KT bądź wbudowywania KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe do stężenia kwasów tłuszczowych niezwiązanych z albuminą, gdyż cząsteczka KT aby zostać wychwycona przez komórkę musi najpierw oddysocjować z kompleksu z albuminą i wejść do puli NKT. Badacze ci stwierdzili, że wychwyty KT odniesiony do stężenia NKP, obliczonego metodą opisaną przez Spectora i wsp. (1971), wykazuje tendencję do wysycania się. Również Budohoski i wsp. (1996) po zastosowaniu zabiegu matematycznego polegającego na przedstawieniu uzyskanych danych w zależności od stężenia NKP obliczonego tą metodą otrzymali krzywą wskazującą na tendencję do wysycania się tempa wbudowywania KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe wraz ze wzrostem zawartości NKP w medium perfuzyjnym. Obecnie nie kwestionuje się faktu, że przy stałym stężeniu albuminy w osoczu czy medium inkubacyjnym bądź perfuzyjnym wraz ze zwiększaniem się stężenia całkowitego kwasów tłuszczowych proporcjonalnie wzrasta również wychwyty KT. Należy jednak podkreślić, że w takich warunkach wzrostowi całkowitego stężenia KT towarzyszy wzrost stężenia NKT. Wobec tego na podstawie uzyskanych w ten sposób danych wciąż nie można rozstrzygnąć czy i w jakim stopniu wychwyty KT zależą od puli KT związanych z albuminą czy też od stężenia NKT. Słusznym wydaje się więc założenie, że dopiero określenie zmian wychwytu KT przez mięśnie szkieletowe w warunkach zwiększonego całkowitego stężenia KT w medium perfuzyjnym przy jednoczesnym utrzymaniu stężenia NKT na stałym poziomie może umożliwić odpowiedź na to pytanie. Będzie to przedmiotem dyskusji w następnym podrozdziale.

**Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy wzrastającym całkowitym stężeniu kwasu palmitynowego i stałym stężeniu niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym**

Jak wspomniano we Wstępie albumina posiada około 10 miejsc wiążących kwasy tłuszczowe, których powinowactwo do KT maleje wraz z ich zapełnianiem. Stężenie NKT jest funkcją stosunku całkowitego stężenia KT do stężenia albuminy ( $v$ ) i określane jest

przez stałe równowagi wiązania cząsteczek kwasu tłuszczowego z miejscami wiążącymi albuminy.

Jedną z pierwszych publikacji w której opisano próbę wyznaczenia stałych dysocjacji KT z kompleksu z albuminą była cytowana wyżej praca Spectora i wsp. (1971). Autorzy ci zmierzili stężenia NKT ekstrahując tę pulę z fazy wodnej gdzie znajdował się kompleks albumina-KT przy pomocy n-heptanu. Znacznie później Richieri i wsp. (1993) do pomiaru stężenia NKT i wyznaczenia stałych dysocjacji wykorzystali fluorescencyjną pochodną jelitowego białka wiążącego kwasy tłuszczowe szczura (ADIFAB), której fluorescencja zmienia się po przyłączeniu cząsteczki KT. Na podstawie zmian fluorescencji określono wielkość puli NKT w buforze przy różnych stosunkach całkowitego stężenia KT do albuminy. Otrzymano w ten sposób wartości stężeń NKT rzędu kilkunastu do kilkudziesięciu nM dla fizjologicznych  $v$  (0,3-3,0), a więc znacznie niższe od podanych przez Spectora i wsp. (1971). Autorzy podkreślają, że pomiar przy użyciu ADIFAB ma szereg zalet w porównaniu z metodą zastosowaną przez Spectora i wsp. (1971), m.in. nie jest obciążony potencjalnym błędem wynikającym z obecności w układzie n-heptanu, który może zaburzać wiązanie się cząsteczek KT z albuminą i może być wykorzystany do pomiaru stężenia NKT bezpośrednio w osoczu (Richieri i wsp., 1993). Inną próbę określenia stężenia NEFA podjęli Rose i wsp. (1994) przy użyciu albuminy kowalencyjnie związanej z Sepharose 4B stwierdzając, że otrzymane przez nich stężenia NKP, podobnie jak w pracy Richieriego i wsp. (1993), są znacznie niższe od podawanych przez Spectora i wsp. (1971).

Wobec powyższego w obecnej pracy do wyliczenia stężeń NKP wykorzystano wzór podany przez Richieri i wsp. (1993). Do doświadczeń użyto komercyjnie dostępną albuminę z krwi wołowej, gdyż albumina szczurza jest praktycznie nie dostępna w większych ilościach. Zgodnie z danymi doświadczalnymi Richieri i wsp. (1993) powinowactwo tej albuminy do kwasu palmitynowego jest znacznie wyższe od albuminy szczurzej w związku z czym przy tym samym  $v$  stężenie NKP w medium zawierającym albuminę wołową będzie niższe niż w medium zawierającym albuminę szczurzą, czy też u szczura w warunkach *in vivo* (Tab. 7). W związku z powyższym w obecnej pracy



Tab. 7.

Przykładowe stężenia NKP w medium zawierającym albuminę wołową bądź szczurzą obliczone według równania Richieri i wsp. (1993).

ALBUMINA WOŁOWA				ALBUMINA SZCZURZA			
C <sub>ALB</sub> [%]	C <sub>KP</sub> [mM]	v	C <sub>NKP</sub> [nM]	C <sub>ALB</sub> [%]	C <sub>KP</sub> [mM]	v	C <sub>NKP</sub> [nM]
4	0,7	1,19	6,12	4	0,2	0,34	4,07
4	0,8	1,36	7,07	4	0,3	0,51	5,97
4	0,9	1,53	8,06	4	0,4	0,68	7,94
4	1,0	1,70	9,10	4	0,5	0,85	10,00
4	1,1	1,87	10,21	4	0,6	1,02	12,17
4	1,2	2,04	11,40	4	0,7	1,19	14,49
4	1,3	2,21	12,68	4	0,8	1,36	16,97
4	1,4	2,38	14,08	4	0,9	1,53	19,66
4	1,5	2,55	15,62	4	1,0	1,70	22,62
4	1,6	2,72	17,33	4	1,1	1,87	25,90
4	1,7	2,89	19,26	4	1,2	2,04	29,58
4	1,8	3,06	21,43	4	1,3	2,21	33,75
4	1,9	3,23	23,93	4	1,4	2,38	38,53
4	2,0	3,40	26,80	4	1,5	2,55	44,06

C<sub>ALB</sub> – stężenie albuminy

C<sub>KP</sub> – stężenie kwasu palmitynowego

C<sub>NKP</sub> – stężenie niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego

v – stosunek stężenia kwasu palmitynowego do stężenia albuminy

wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe badano przy  $v=1,70$ , przy którym wielkość puli NKP odpowiada w przybliżeniu stężeniu NKP przy fizjologicznych wartościach  $v=0.85$  gdyby do doświadczeń użyto albuminy szczurzej. Innymi słowy w medium perfuzyjnym zawierającym fizjologiczne stężenie albuminy wołowej na poziomie 4% i 1,0 mM KP wielkość puli NKP odpowiada puli NKP, którą uzyskano by stosując medium zawierające 4% albuminy szczurzej i 0,4-0,5 mM KP.

Stosując układ doświadczalny w którym przy wzrastającym stężeniu całkowitym kwasu palmitynowego stężenie tego kwasu niezwiązanego z albuminą (NKP) pozostaje na stałym poziomie można wysunąć następujące hipotezy: 1) jeśli wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe zależy wyłącznie od całkowitego stężenia KP w medium perfuzyjnym wówczas powinno ono wzrastać identycznie jak w doświadczeniach w których równocześnie zwiększane jest całkowite stężenie KP i stężenie NKP. 2) jeśli wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe zależy tylko od puli NKP to przy stałym stężeniu niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego powinno ono pozostać niezmienione, pomimo wzrostu całkowitego stężenia tego kwasu.

Wyniki uzyskane w obecnej pracy wskazują, że wówczas gdy stężenie NKP w medium perfuzyjnym jest stałe, natomiast zwiększane jest całkowite stężenie KP wbudowywanie KP w acyloglicerole mięśnia płaszczkowatego, podeszwowego oraz czerwonych części mięśnia brzuchatego łydki i czworogłowego uda wprawdzie wzrasta jednakże osiąga znacznie niższe wartości niż w doświadczeniach w których zwiększano zarówno całkowite stężenie KP jak i stężenie NKP. Dane te mogą świadczyć, że wbudowywanie KP w acyloglicerole tlenowych mięśni szkieletowych szczura zależy w znacznym stopniu od wielkości puli NKP, chociaż całkowite stężenie KP w medium perfuzyjnym lub, co jest praktycznie tożsame, stężenie kompleksu albumina-KP odgrywają istotną rolę w tym procesie. Odmienne zachowywały się mięśnie glikolityczne (białe części mięśnia brzuchatego łydki oraz czworogłowego uda), w których stwierdzono prawie identyczne wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe przy stałym stężeniu NKP i wzrastającym całkowitym stężeniu KP oraz przy jednocześnie wzrastającym [NKP] i [KP].

Podobnie w innych doświadczeniach prowadzonych w naszym Zakładzie w inkubowanym mięśni płaszczkowatym szczura (Górecka i wsp., 2001), gdy przy stałym  $v$  zwiększano całkowite stężenie KP, stwierdzono istotnie mniejsze wbudowywanie KP w triacyloglicerole wewnątrzmięśniowe oraz utlenianie KP niż w doświadczeniu w którym wzrastało zarówno całkowite stężenie KP jak i stężenie NKP. Glatz i Veerkamp (1982) badając utlenianie KP w inkubowanym mięśni przepony szczura stosowali różne stężenia albuminy (0,1 – 0,6 mM) i kwasu palmitynowego (0,1 - 3,0) w medium inkubacyjnym. Wykazali oni, że utlenianie KP wzrasta gdy przy danym stężeniu całkowitym kwasu palmitynowego zmniejszone zostanie stężenie albuminy, czyli wówczas gdy podwyższone zostanie stężenie NKP w medium inkubacyjnym co wskazuje, że utlenianie KP zależy od wielkości puli NKP. Badacze ci zaobserwowali także, że przy stałym  $v$ , a więc stałym stężeniu NKP, utlenianie KP wzrasta wraz ze wzrostem całkowitego stężenia tego kwasu, co z kolei świadczy, że na proces utleniania ma również wpływ całkowite stężenie KP.

Zwiększenie początkowego tempa wychwytu kwasu palmitynowego przez izolowane przy pomocy kolagenazy kardiomiocyty szczura wraz ze wzrostem stężenia kompleksu albumina-KP, czyli przy stałym stężeniu NKP w medium inkubacyjnym opisali Luiken i wsp. (1997). Autorzy ci zastosowali zróżnicowane stężenie albuminy (10-300  $\mu$ M) i stały stosunek stężeń KP do albuminy - 0,3. W powyższych warunkach doświadczalnych silny stymulujący wpływ kompleksu albumina-kwas palmitynowy na tempo wychwytu KP ujawnił się tylko przy niskich stężeniach albuminy, natomiast po przekroczeniu stężenia 30  $\mu$ M tempo wychwytu KP przez kardiomiocyty wzrastało tylko nieznacznie. Wyniki te częściowo pokrywają się z danymi uzyskanymi wcześniej przez Sorrentino i wsp. (1988), którzy stwierdzili, że w przy stałym  $v=1$  w izolowanych kardiomiocytach psa wychwyty kwasu oleinowego wzrasta wraz ze wzrostem całkowitego stężenia kwasu oleinowego w zakresie około 0-50  $\mu$ M po czym osiąga plateau. Gdy zwiększono  $v$  osiągnięcie plateau następowało przy wyższych stężeniach kwasu oleinowego. Nieco odmiennie wyniki uzyskali Rose i wsp. (1990), którzy również zbadali początkowe tempo wychwytu kwasu palmitynowego przez izolowane przy pomocy kolagenazy kardiomiocyty szczura.

Stwierdzili oni, że przy wzroście stężenia kompleksu albumina-KP w medium inkubacyjnym w zakresie od 20 do 284  $\mu\text{M}$  przy  $v=1$  wychwyty KP pozostawał na niezmiennym poziomie. Według tych autorów wychwyty kwasów tłuszczowych przez kardiomiocyty zależy więc wyłącznie od stężenia NKP. Sorrentino i wsp. (1988) zaprezentowali pogląd, że zależność wychwyty KT od stężenia kompleksu albumina-KT ujawnia się tylko przy niskich stężeniach kompleksu i wynika z powolnej w tych warunkach dysocjacji KT od albuminy. Wydaje się jednak, że przy niskich stężeniach nie dysocjacja kompleksu ale raczej dyfuzja kompleksu lub KT może ograniczać „dostawę” KT do błony komórkowej. Wówczas to zwiększenie stężenia albuminy może ułatwić przechodzenie kwasu palmitynowego pomiędzy cząsteczkami albuminy. W konsekwencji gdy kwas palmitynowy zostanie wychwycony przez komórkę możliwe byłoby szybsze uzupełnienie puli KT znajdującej się w pobliżu jej błony komórkowej. Koncepcji Sorrentino i wsp. (1988) nie potwierdzają wyniki, które uzyskali Trigatti i Gerber (1995). Stwierdzili oni bowiem stymulujący wpływ albuminy na wychwyty kwasu oleinowego przez adipocyty 3T3-L1 nawet wówczas gdy jej stężenie w medium inkubacyjnym wynosiło 1000  $\mu\text{M}$ . Co więcej, autorzy ci wykazali, że również wiązanie się albuminy z błoną komórkową adipocytów 3T3-L1 zwiększa się w tym zakresie stężeń. Podobne wyniki uzyskano badając oddziaływanie albuminy na kardiomiocyty szczura (Trigatti i Gerber, 1995).

Wciąż jeszcze nie jest jasne w jaki sposób oddziaływanie kompleksu albumina-KT ze ścianą komórkową wspomaga wychwyty KT. Z jednej strony albumina wiąże się w sposób niespecyficzny z wieloma materiałami m.in. szkłem, polimerami czy też błonami komórkowymi (Trigatti i Gerber, 1995), z drugiej, zaś, jak zbadano przy użyciu technik spektroskopowych, wiązaniu się kompleksu albumina-KT z błoną komórkową hepatocytów towarzyszą zmiany jej konformacji. Ułatwia to prawdopodobnie rozpad kompleksu (Horie i wsp., 1988) co wskazywałoby na bezpośredni udział albuminy w wychwyty KT. Bezpośrednie przejście cząsteczki KT z kompleksu z albuminą do błony komórkowej pozwalałoby również zminimalizować niekorzystną energetycznie ekspozycję KT na środowisko polarne osocza (Trigatti i Gerber, 1995). Z kolei, wydaje się, że ABP, czyli białka wiążące albuminę, które przypuszczalnie odpowiadają za oddziaływanie

albuminy z błoną komórkową przy stężeniu albuminy rzędu 0,6 mM są już wysyczone (Van der Vusse i wsp., 1998) więc oddziaływaniem kompleksu albumina-KT z ABP nie można by wytłumaczyć stwierdzonego w obecnej pracy zwiększonego wbudowywania KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe mięśni o przewodze włókien tlenowych w warunkach zwiększonego stężenia albuminy w medium perfuzyjnym z około 0,6 mM (4%) do 1,2 mM (8%). Na podstawie zebranych w pracy wyników i danych dostępnych w piśmiennictwie trudno jest zaproponować mechanizm wyjaśniający w jaki sposób KT znajdujące się w kompleksie z albuminą są zaangażowane w procesie wychwytu KT przez mięśnie szkieletowe. Z drugiej strony wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy wskazują na istnienie jeszcze jednej różnicy pomiędzy mięśniami tlenowymi i glikolitycznymi, a mianowicie, że w odróżnieniu od mięśni glikolitycznych wbudowywanie kwasów tłuszczowych w acyloglicerole mięśni tlenowych zależy nie tylko od wielkości puli niezwiązanych z albuminą kwasów tłuszczowych, ale także w pewnym stopniu od całkowitego stężenia kwasów tłuszczowych.

**Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów poddanych ekspozycji na niską temperaturę otoczenia (6 °C) przez 12 godzin**

Podczas ekspozycji na niską temperaturę otoczenia mięśnie szkieletowe intensywnie wykorzystują kwasy tłuszczowe jako substrat energetyczny. Zwierzęta na których przeprowadzono badania niniejszej serii doświadczalnej trzymano przez 12 godz. w temperaturze 6°C. Następnie, szczury przygotowywano operacyjnie zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiał i metody”, po czym, kończyny tylne szczurów perfundowano w temperaturze 37°C. Ze względu na to, że perfuzję właściwą poprzedza 30 min. pre-perfuzja, również w temperaturze 37°C, w zastosowanym układzie doświadczalnym można było więc tylko zbadać czy ekspozycja na niską temperaturę otoczenia zmieni wbudowywanie kwasów tłuszczowych w acyloglicerole mięśni szkieletowych po 45-60 minutach od powrotu do neutralnej temperatury otoczenia. Innymi słowy, w powyższym układzie możliwe było badanie wpływu tylko „trwałych” zmian

modyfikujących wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe wywołanych przez ekspozycję na zimno. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych na ten temat. Przykładem tego typu zmiany wywołanej przez ekspozycję na niską temperaturę otoczenia, aczkolwiek nie związanej bezpośrednio z wychwytem KT, jest zmiana zawartości w mięśniach szkieletowych białka rozprężającego UCP-3. Zgodnie z modelem zaproponowanym przez Hamiltona (1998) UCP są transporterami przenoszącymi aniony kwasów tłuszczowych z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy wewnętrznej błony mitochondrium. Aniony KT są następnie protonowane i powracają na drodze dyfuzji do wewnętrznej warstwy błony, co w efekcie powoduje zmniejszenie gradientu protonowego, rozprężenie fosforylacji oksydacyjnej od syntezy ATP i rozproszenie energii w postaci ciepła. Lin i wsp. (1998) stwierdzili, że już po 6-24 godzinach ekspozycji na zimno zawartość UCP-3 w mięśniach szkieletowych wzrasta dwu- / czterokrotnie. Zawartość UCP-3 w mięśniach szkieletowych myszy powraca do poziomu wyjściowego dopiero po 12 godzinach od ich powrotu do neutralnej temperatury otoczenia (Masaki i wsp., 2000).

Wyniki obecnej pracy wskazują, że u zwierząt eksponowanych przez 12 godzin na niską temperaturę otoczenia (6°C) nastąpiła mobilizacja kwasów tłuszczowych czego wyrazem było istotne podwyższenie stężenia KT we krwi. W innych badaniach naszego Zakładu stwierdzono, że podwyższenie KT we krwi szczurów przebywających w temperaturze 6°C następuje już po 3 godzinach ekspozycji (wyniki niepublikowane). Jednakże, podczas perfuzji, nie stwierdzono istotnych zmian wbudowywania KP w acyloglicerole ani w mięśniach o przewodze włókien tlenowych i tlenowo-glikolitycznych, ani w mięśniach o przewodze włókien glikolitycznych. Można więc przypuszczać, że nawet gdyby 12-to godzinna ekspozycja na niską temperaturę otoczenia modyfikowała wbudowywanie KT, to modyfikacja ta nie była na tyle trwała aby można ją było stwierdzić w zastosowanym w obecnej pracy układzie doświadczalnym.

Być może w obecnych doświadczeniach miała miejsce sytuacja podobna do opisanej przez Bonena i wsp. (2000) u szczurów których mięśnie kończyn tylnych

poddano stymulacji elektrycznej. Dane piśmiennictwa wskazują, że zarówno w warunkach *in vitro* (Dyck i Bonen, 1998), przy użyciu techniki *in situ* perfuzji kończyn tylnych (Turcotte i wsp., 1998) jak i w warunkach *in vivo* (Górski i Bonen, 1997) stymulacja elektryczna mięśni szkieletowych szczura powoduje zwiększenie wychwytu oraz wbudowywania KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe. W cytowanej wyżej pracy (Bonen i wsp., 2000) stwierdzono, że podczas 30 min. stymulacji elektrycznej w sarkolemie mięśni szkieletowych zwiększa się ilość FAT, białka o którym sądzi się, że wspomaga wychwyt KT (Ibrahimi i wsp., 1999). Nie towarzyszy temu natomiast zwiększenie całkowitej zawartości FAT w komórce, a poziom FAT w sarkolemie mięśni szkieletowych powraca do wartości kontrolnych po 60 min. od zakończenia stymulacji (Bonen i wsp., 2000). Sugeruje to, że podczas 30 min. stymulacji FAT jedynie przemieszcza się z „głębi komórki” do błony komórkowej i zmiana ta nie ma charakteru „trwałego”. Dopiero długotrwała stymulacja elektryczna prowadzi do zwiększenia całkowitej zawartości FAT w mięśniach szkieletowych (Bonen i wsp., 1999).

**Wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów poddanych 48 godzinnemu głodzeniu.**

W kolejnej serii badań obecnej pracy stwierdzono, że u szczurów głodzonych przez 48 godz. wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe jest o 100-200% wyższe niż u szczurów kontrolnych. Efekt ten stwierdzono zarówno w mięśniach o przewodzie przemian tlenowych jak i w mięśniach o przewodzie metabolizmu beztlenowego. W czasie krótkotrwałego głodu w organizmie szczura nasila się metabolizm KT, zwiększa się lipoliza w tkance tłuszczowej i stężenie KT we krwi. Głodzenie przez okres 48 godz. prowadzi do zmniejszenia masy ciała szczurów (Vallerand i wsp., 1983), jednak rozpad białek mięśniowych jest wciąż jeszcze niewielki (Goodman i Ruderman, 1980, Goodman i wsp., 1980). Nie zmienia się ponadto ilość fosfolipidów na gram tkanki mięśni szkieletowych, co świadczy, że nie naruszone są fosfolipidy błon komórkowych i utrzymana jest struktura tych błon (Masoro, 1967).

Turcotte i wsp. (1997) stwierdzili, że dopiero po 48 godzinach głodzenia w mięśniach tlenowych szczura zachodzą zmiany adaptacyjne polegające na zwiększeniu w błonach komórkowych miocytów zawartości FABPpm, białka przypuszczalnie wspomagającego wychwyt KT przez komórki. Z tego względu w badaniach własnych wybrano 48 godzinny okres głodzenia. Zgodnie ze schematem opisanym w rozdziale Materiał i Metody do mięśni, oprócz KP, z medium perfuzyjnym dostarczana była także glukoza i insulina w stężeniach fizjologicznych. Powyższy układ odpowiadał więc w istocie sytuacji w której zwierzę zostałoby nakarmione po okresie głodzenia.

Na podstawie zmian współczynnika oddechowego (RQ) Chien i wsp. (2000) stwierdzili, że po nakarmieniu szczurów uprzednio głodzonych przez 48 godz. utlenianie KT ulega gwałtownemu zahamowaniu. Wydaje się, że ważną rolę pełni tutaj malonylo-CoA (Merrill i wsp., 1998), inhibitor transferazy acylo-karnitynowej 1 (CPT-1), enzymu kluczowego dla transportu KT do wnętrza mitochondriów, gdzie zachodzi  $\beta$ -oksydacja (Eaton i wsp., 1996). Zwiększone tempo utleniania KT w perfundowanych mięśniach szkieletowych szczura po obniżeniu wewnątrzkomórkowego poziomu malonylo-CoA przy pomocy 5-aminoimidazolo-4-karboxyamido-1- $\beta$ -D-ribofuranozydu (AICA rybozydu) stwierdzili Merrill i wsp. (1998). Zahamowaniu utleniania KT po nakarmieniu towarzyszy kilkudziesięcioprocentowy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia malonylo-CoA w mięśniach szkieletowych szczura (Winder i wsp., 1995, Chien i wsp., 2000) oraz obniżenie zawartości acylokarnityny co wskazuje, że w tych warunkach acylotransferaza karnitynowa CPT-1 blokowana jest przez malonylo-CoA (Chien i wsp., 2000). Kilkakrotny wzrost zawartości malonylo-CoA stwierdzono także w mięśniu płaszczkowatym po 20 min. inkubacji w medium z glukozą i insuliną (Ruderman i wsp., 1999). W komórce malonylo-CoA syntezowany jest przy udziale enzymu karboksylazy acylo-CoA (ACC), natomiast rozkładany przez dekarboksylazę malonylo-CoA (MCD) (Young i wsp., 2001). ACC może być hamowana kowalencyjnie na drodze fosforylacji przez kinazę białkową aktywowaną AMP (AMPK) (Merrill i wsp., 1998) lub allosterycznie przez nadmiar acylo-CoA (Trumble i wsp., 1995). Wydaje się, że w mięśniach szkieletowych pierwszy z tych mechanizmów odgrywa znaczną rolę podczas wysiłku fizycznego, gdyż wraz ze



zmniejszeniem aktywności ACC odnotowano wzrost aktywności AMPK (Rasmussen i wsp., 1997), natomiast ten drugi mechanizm ma prawdopodobnie ważne znaczenie w czasie głodu (Winder i wsp., 1995). Z kolei w przypadku MCD, głód powoduje czterokrotny wzrost ilości mRNA MCD w tlenowym mięśniu płaszczkowym i mieszanym prostowniku długim palca (*extensor digitorum longus*), ale nie towarzyszy temu zwiększenie aktywności tego enzymu (Young i wsp., 2001). Nakarmienie zwierząt po głodzeniu obniża zawartość mRNA MCD do poziomu kontrolnego. Young i wsp. (2001) stwierdzili także, że stymulacji proliferatora peroksysomów alfa (PPAR- $\alpha$ ) towarzyszy zwiększenie zawartości mRNA MCD w mięśniu płaszczkowym i w prostowniku długim palca oraz wzrost aktywności MCD w mięśniu płaszczkowym. Po stymulacji proliferatora peroksysomów gamma (PPAR- $\gamma$ ) zaobserwowano obniżenie zawartości mRNA MCD nie wpływające jednak na aktywność MCD. Pozwala to przypuszczać, że stymulacja ekspresji MCD przez kwasy tłuszczowe odbywa się przy udziale PPAR- $\alpha$  (Young i wsp., 2001). Wciąż jeszcze nie jest jednak jasne jaki mechanizm odpowiada za wzrost wewnątrzkomórkowej zawartości malonylo-CoA po nakarmieniu, gdyż w warunkach tych nie stwierdzono ani wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cytrynianu, allosterycznego aktywatora ACC, ani wzrostu ilości ACC, bądź też zmniejszenia aktywności MCD (Chien i wsp., 2000). Być może zwiększenie dostępności acetylo-CoA powstałego w wyniku katabolizmu glukozy, substratu dla ACC, jest przyczyną wzrostu wewnątrzkomórkowej zawartości malonylo-CoA (Sidossis i wsp., 1996). Dodatkowo, z dostępnego w nadmiarze acetylo-CoA może powstawać acetylokarnityna, co zmniejsza dostępność karnityny dla KT i w konsekwencji utlenienie KT (Sidossis i wsp., 1996).

Wobec powyższych wywodów stwierdzenie w obecnej pracy zwiększonego wbudowywania KP w acyloglicerole w mięśniach o przewodze włókien tlenowych u szczurów głodzonych przez 48 godz. w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi wydaje się zrozumiałe. Jak wspomniano wyżej po 48 godz. głodzenia zwiększa się ilość FABPpm w błonach komórkowych miocytów (Turcotte i wsp., 1995) co pozwala mięśniom wychwycić większą ilość kwasów tłuszczowych, jednocześnie natomiast obniżenie zawartości glikogenu (Bentham i wsp., 1995) nie wpływa na wychwyt i utlenianie KT.

Wobec zahamowania procesu utleniania KT po nakarmieniu nadmiar kwasów tłuszczowych znajdujących się w cytosolu jest zużywany do syntezy triacylogliceroli. Interesujące jest, że jak wykazano w obecnej pracy znacząco wzrasta również wbudowywanie KP w acyloglicerole mięśni glikolitycznych, w których (Turcotte i wsp., 1997) nie stwierdzono zwiększonej ilości FABP<sub>pm</sub> po 48 godz. głodzenia. Wydaje się prawdopodobne, że mięśnie tego typu „adaptują się” do głodu w jakiś inny sposób co wymaga jednak dalszych badań.

Podsumowując, w obecnej pracy stwierdzono, że wbudowywanie KP w acyloglicerole mięśni szkieletowych u szczurów poddanych głodzeniu przez 48 godz. i perfundowanych medium zawierającym zarówno kwas palmitynowy, jak i glukozę oraz insulinę znacząco wzrasta niezależnie od typu mięśni.

glikolitycznych

3) Znacząco

acyloglicerole w

stężenie KP, a

wzrostem całkowitego

acyloglicerole

kompleksie z

metabolizmu ko

4) U szcz

12 godzin

wewnątrzmięśniowych

tłuszczowych

powoduje pow

wbudowywanie

5) Głowa

szczurów podd

kontrolnych

## 7. Podsumowanie i wnioski

1) Wykazano, że wbudowywanie kwasów tłuszczowych w pulę acylogliceroli wewnątrzmięśniowych wzrasta wprost proporcjonalnie do czasu trwania perfuzji. Stwierdzono natomiast, że względne wbudowywanie kwasu palmitynowego w oceniane frakcje lipidów (TG, DG/MG, PL) nie zmienia się wraz z czasem perfuzji.

2) Wraz ze wzrostem w medium perfuzyjnym stężenia zarówno całkowitego jak i niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego stwierdzono zwiększone wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe, szczególnie wyraźnie zaznaczone w mięśniach o przewodze włókien wolnokurczących tlenowych i szybkokurczących tlenowo-glikolitycznych.

3) Znacznie mniejsze wartości wbudowywania kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe stwierdzono wówczas gdy wzrastało tylko całkowite stężenie KP, a [NKP] utrzymywano na stałym poziomie. W warunkach tych wraz ze wzrostem całkowitego [KP] wykazano jednak pewien wzrost wbudowywania tego kwasu w acyloglicerole, co może świadczyć o tym, że wielkość puli KP znajdujących się w kompleksie z albuminą również wpływa na wielkość wychwytu KP na potrzeby metabolizmu komórkowego.

4) U szczurów poddanych ekspozycji na niską temperaturę otoczenia (6 °C) przez 12 godzin nie stwierdzono zwiększonego wbudowywania KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe. Wskazuje to, że pomimo nasilenia wykorzystywania kwasów tłuszczowych jako substratu energetycznego, 12-to godzinna ekspozycja na zimno nie powoduje powstania utrwalonych zmian przystosowawczych modyfikujących wbudowywanie KP w acyloglicerole mięśni szkieletowych.

5) Stwierdzono, że wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów poddanych 48 godzinnemu głodzeniu jest znacznie większe niż u szczurów kontrolnych. Jest to zgodne z danymi piśmiennictwa w których wykazano, że u szczura 48

godzinne głodzenie prowadzi do zwiększenia zawartości w mięśniach szkieletowych białka wspomagającego wychwyty kwasów tłuszczowych (FABPpm).

## 8. Streszczenie

### Wprowadzenie

Głównymi celami obecnej pracy było: 1) prześledzenie przebiegu wbudowywania kwasu palmitynowego w lipidy wewnątrzmięśniowe w różnym czasie trwania perfuzji, 2) zbadanie zależności pomiędzy wbudowywaniem kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe, a całkowitym stężeniem tego substratu w medium perfuzyjnym oraz stężeniem kwasu palmitynowego nie związanego z albuminą (NKP) oraz 3) zbadanie czy wbudowywanie KT w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe ulega modyfikacji u szczurów poddanych uprzednio wpływowi wybranych czynników wpływających stymulująco na wykorzystanie kwasów tłuszczowych przez mięśnie szkieletowe tzn. 12 godzinnej ekspozycji na niską temperaturę otoczenia (6°C) oraz pozbawienia pokarmu przez 48 godzin.

### Metodyka

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach, samcach szczepu Wistar (masa ciała 230 +/- 30g). Wyodrębniono następujące grupy doświadczalne: Grupa I w której perfundowano medium zawierającym 4% albuminy i 1 mM kwasu palmitynowego przez 30, 45 i 60 minut, Grupa II w której perfundowano przez 30 minut medium zawierającym 4% albuminy i zróżnicowane stężenie (1,0 mM, 1.5 mM lub 2,0 mM) kwasu palmitynowego, Grupa III w której perfundowano przez 30 minut medium zawierającym 4%, 6% lub 8% albuminy i odpowiednio 1,0 mM, 1.5 mM lub 2,0 mM kwasu palmitynowego, Grupa IV w której perfundowano kończyny tylne szczurów eksponowanych przez 12 godzin na niską temperaturę otoczenia ( $6 \pm 0,3$  °C), perfuzję prowadzono przy użyciu medium zawierającego 4% albuminy i 1,4 mM kwasu palmitynowego (czas perfuzji 30 min.), Grupa V w której perfundowano kończyny tylne szczurów głodzonych przez 48 godzin, perfuzję prowadzono przy użyciu medium zawierającym 4% albuminy i 1,4 mM kwasu palmitynowego (czas perfuzji 30 min.).

Perfuzję kończyn tylnych wykonano opierając się na zmodyfikowanej procedurze opisanej przez Górskiego i wsp. (1986). Po zakończeniu perfuzji z obu kończyn

zwierzęcia pobierano mięsień płaszczkowaty, mięsień podeszwowy, część czerwoną i białą mięśnia brzuchatego łydki oraz część czerwoną i białą mięśnia czworogłowego uda. W liofilizowanych preparatach mięśniowych badano wbudowywanie znakowanego kwasu palmitynowego w lipidy wewnątrzkomórkowe. W grupie IV i V mierzono stężenie kwasów tłuszczowych we krwi oraz zawartość glikogenu w wątrobie.

### Wyniki

Stwierdzono, że wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe wzrastało liniowo wraz z czasem trwania perfuzji w ocenianym zakresie 30, 45 i 60 min. we wszystkich badanych typach mięśni. Tempo wbudowywania kwasu palmitynowego było istotnie szybsze w mięśniach tlenowych / tlenowo-glikolitycznych niż glikolitycznych, co jest zgodne z różnicami w wykorzystywaniu KT przez te mięśnie. Stwierdzono również, że procentowe wbudowywania KP w lipidy wewnątrzmięśniowe nie zależy od czasu trwania perfuzji w badanym przedziale czasowym. Wbudowywanie KP w TG było największe (ponad 70%) w mięśniu płaszczkowatym oraz w czerwonych częściach mięśnia brzuchatego łydki i czworogłowego uda. Procentowe wbudowywanie w DG/MG nie różniło się istotnie w zależności od czasu perfuzji za wyjątkiem czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki w którym wbudowywanie w DG/MG po 60 min. było istotnie niższe niż po 30 i 45 min. Procentowe wbudowywanie w fosfolipidy (PL) było we wszystkich badanych typach mięśni niewielkie, rzędu kilku procent. W mięśniu podeszwowym i w białej części mięśnia brzuchatego łydki procentowe wbudowywanie kwasu palmitynowego w PL po 60 min. perfuzji było istotnie niższe niż po 30 i 45 minutach. →

Zbadano wbudowywanie KP podczas 30 min. perfuzji medium zawierającym 4% albuminy oraz całkowite stężenie kwasu palmitynowego 1,0, 1,5 lub 2,0 mM. W powyższych warunkach stężenie NKP, wzrastało i wynosiło odpowiednio: 9,10, 15,62 i 26,80 nM. Wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w czerwonej części mięśnia czworogłowego uda, mięśniu płaszczkowatym i w czerwonej części mięśnia brzuchatego łydki wzrastało istotnie statystycznie ( $p < 0.05$ ) wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP i [NKP] w medium perfuzyjnym. Nieco mniejsze było wbudowywanie KP w

acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w mieszanym mięśniu podszwawym, przy czym różnica pomiędzy wbudowywaniem KP w ten mięsień przy stężeniu 1,5 i 2,0 mM była nieistotna statystycznie wskazując, że proces ma tendencję do wysycania się. W białej części mięśnia brzuchatego łydki i czworogłowego uda wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe było znacznie mniejsze niż w mięśniach o przewodze włókien tlenowych bądź tlenowo-oksydacyjnych. Wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP i [NKP] w medium perfuzyjnym wbudowywanie KP w białej części mięśnia czworogłowego uda wykazywało jedynie tendencję wzrostową, a istotny wzrost odnotowano wyłącznie przy 2,0 mM w porównaniu do 1,0 mM.

W kolejnej serii doświadczeń zbadano zależność wbudowywania kwasu palmitynowego (KP) od stężenia całkowitego tego kwasu w medium perfuzyjnym (1,0, 1,5 i 2,0 mM) w warunkach gdy stężenie niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego w medium perfuzyjnym (NKP) było stałe i wynosiło 9,10 nM. W czerwonej części mięśnia czworogłowego uda, mięśni płaszczkowatym, czerwonej części mięśnia brzuchatego oraz mięśni podszwawym wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe wzrastało wraz ze wzrostem całkowitego stężenia KP. Jednakże w przypadku wszystkich powyższych mięśni wartości uzyskane w obecnej serii doświadczalnej przy 1,5 mM i 2,0 mM KP były istotnie niższe niż wartości uzyskane w serii doświadczalnej, w której wzrostowi całkowitego stężenia KP towarzyszył wzrost stężenia NKP. W białej części mięśnia brzuchatego łydki stwierdzono istotny wzrost wbudowywania KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe jedynie pomiędzy 1,0 i 2,0 mM KP, nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami uzyskanymi w poprzednich doświadczeniach w których jednocześnie zwiększano stężenie KP oraz NKP i obecnymi doświadczeniami. Bardzo podobnie przedstawiało się wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe w białej części mięśnia czworogłowego uda.

Wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u zwierząt poddanych 12h chłodzeniu w komorze termicznej o temperaturze 6 °C, a następnie perfundowanych medium zawierającym 4% albuminy i 1,4 mM kwasu palmitynowego nie różniło się istotnie

w przypadku żadnego z badanych mięśni od wbudowywania KP w acyloglicerole u szczurów nie chłodzonych.

Wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u zwierząt głodzonych przez 48h, których kończyny tylne perfundowano następnie medium zawierającym 4% albuminy i 1,4 mM kwasu palmitynowego zwiększało się istotnie statystycznie we wszystkich badanych mięśniach w porównaniu ze zwierzętami karmionymi ad libitum, a pozbawianymi pokarmu tylko na 12 godz. Wbudowywanie w czerwoną część mięśnia czworogłowego uda, mięsień płaszczkowaty oraz w czerwoną część mięśnia brzuchatego łydki było po głodzeniu największe. Najniższe wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe stwierdzono zaś w białej części mięśnia brzuchatego łydki oraz białej części mięśnia czworogłowego uda.

### **Podsumowanie**

Uzyskane wyniki doświadczalne pozwoliły wysunąć następujące wnioski:

1) wbudowywanie kwasów tłuszczowych w pulę acylogliceroli wewnątrzmięśniowych wzrasta wprost proporcjonalnie do czasu trwania perfuzji, natomiast względne wbudowywanie kwasu palmitynowego w oceniane frakcje lipidów (TG, DG/MG, PL) nie zmienia się wraz z czasem perfuzji.

2) wraz ze wzrostem w medium perfuzyjnym stężenia zarówno całkowitego jak i niezwiązanego z albuminą kwasu palmitynowego stwierdzono zwiększone wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe, szczególnie wyraźnie zaznaczone w mięśniach o przewodze włókien wolnokurczących tlenowych i szybko kurczących tlenowo-glikolitycznych.

3) gdy wzrasta tylko całkowite stężenie KP, a [NKP] utrzymywane jest na stałym poziomie wbudowywanie kwasu palmitynowego w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe również wzrasta lecz wolniej niż wówczas gdy w medium perfuzyjnym wzrasta zarówno stężenie KP jak i NKP. Może to świadczyć o tym, że wielkość puli KP znajdujących się w kompleksie z albuminą również wpływa na wielkość wychwytu KP na potrzeby metabolizmu komórkowego.



4) u szczurów poddanych ekspozycji na niską temperaturę otoczenia (6 °C) przez 12 godzin nie stwierdzono zwiększonego wbudowywania KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe. Wskazuje to, że pomimo nasilenia wykorzystywania kwasów tłuszczowych jako substratu energetycznego, 12-to godzinna ekspozycja na zimno nie powoduje powstania utrwalonych zmian przystosowawczych modyfikujących wbudowywanie KT w acyloglicerole mięśni szkieletowych.

5) wbudowywanie KP w acyloglicerole wewnątrzmięśniowe u szczurów poddanych 48 godzinnemu głodzeniu jest znacznie większe niż u szczurów kontrolnych. Jest to zgodne z danymi piśmiennictwa w których wykazano, że u szczura 48 godzinne głodzenie prowadzi do zwiększenia zawartości w mięśniach szkieletowych białka wspomagającego wychwyty kwasów tłuszczowych (FABPpm).

## 9. Piśmiennictwo

1. Abumrad N.A., el-Maghrabi M.R., Amri E.Z., Lopez E., Grimaldi P.A. 1993: Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 268(24): 17665-17668.
2. Abumrad N.A., Park J.H., Park C.R. 1984: Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein. *J. Biol. Chem.* 259(14): 8945-8953.
3. Abumrad N.A., Perkins R.C., Park J.H., Park C.R. 1981: Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. *J. Biol. Chem.* 256(17): 9183-9191.
4. Abumrad N.A., Stearns S.B., Tepperman H.M., Tepperman J. 1978: Studies on serum lipids, insulin, and glucagon and on muscle triglyceride in rats adapted to high-fat and high-carbohydrate diets. *J. Lipid Res.* 19(4): 423-432.
5. Adan C., Ardevol A., Remesar X., Alemany M., Fernandez-Lopez J.A. 1995: Hindleg muscle energy and substrate balances in cold-exposed rats. *J. Exp. Biol.* 198 ( Pt 6): 1243-1251.
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. Bioll.* 60: 268-275.
7. Armstrong R.B., Phelps R.O. 1984: Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anatomy.* 171(3): 259-72.
8. Avakian E.V., Horvath S.M. 1981: Starvation suppresses sympathoadrenal medullary response to cold exposure in rats. *Am. J. Physiol.* 241(4): E316-E320.

9. Bell A.W., Thompson G.E. 1979: Free fatty acid oxidation in bovine muscle in vivo: effects of cold exposure and feeding. *Am. J. Physiol.* 237(4): E309-E315.
10. Benthem L., van der Leest J., Steffens AB., Zijlstra WG. 1995: Metabolic and hormonal responses to adrenoceptor antagonists in 48-hour-starved exercising rats. *Metabolism: Clinical & Experimental.* 44(10):1332-1339.
11. Berk P.D., Stump D.D. 1999: Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.* 192(1-2): 17-31.
12. Berk P.D., Zhou S.L., Kiang C.L., Stump D., Bradbury M., Isola L.M. 1997: Uptake of long chain free fatty acids is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 272(13): 8830-8835.
13. Bonen A., Clark M.G., Henriksen E.J. 1994. Experimental approaches in muscle metabolism: hindlimb perfusion and isolated muscle incubations. *Am. J. Physiol.* 266(1 Pt 1): E1-E16.
14. Bonen A., Dyck D.J., Ibrahimi A., Abumrad N.A. 1999: Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36. *Am. J. Physiol.* 276(4 Pt 1): E642-E649.
15. Bonen A., Dyck D.J., Luiken J.F.P. 1998(a): Skeletal muscle fatty acid transport and transporters. w: *Skeletal muscle metabolism in exercise and diabetes.* Plenum Press, New York, 193-205.
16. Bonen A., Luiken J.J., Arumugam Y., Glatz J.F., Tandon N.N. 2000: Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.* 275(19): 14501-14508.
17. Bonen A., Luiken J.J., Liu S., Dyck D.J., Kiens B., Kristiansen S., Turcotte L.P. van Der Vusse G.J., Glatz J.F. 1998(b): Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *Am. J. Physiol.* 275(3 Pt 1): E471-E478.

18. Borgstrom B., Olivecrona T. 1961: The metabolism of palmitic acid-1-C14 in functionally hepatectomized rats. *J. Lipid Res.* 2: 263-267.
19. Budohoski L., Górski J., Nazar K., Kaciuba-Uściłko H., Terjung R.L. 1996: Triacylglycerol synthesis in the different skeletal muscle fiber sections of the rat. *Am. J. Physiol.* 271(3 Pt 1): E574-E581.
20. Burczynski F.J., Cai Z.S. 1994: Palmitate uptake by hepatocyte suspensions: effect of albumin. *Am. J. of Physiol.* 267(3 Pt 1): G371-G379.
21. Calles-Escandon J., Sweet L., Ljungqvist O., Hirshman M.F. 1996: The membrane-associated 40 KD fatty acid binding protein (Berk's protein), a putative fatty acid transporter is present in human skeletal muscle. *Life Sci.* 58(1): 19-28.
22. Carrol K. K. 1976: *Lipid Chromatographic Analysis.* (Dekker, New York), vol.1: 173-214.
23. Carrol K.K., Serdarevich B. 1967: *Lipid Chromatographic Analysis.* (Dekker, New York), vol.1: 205-237.
24. Chien D., Dean D., Saha A.K., Flatt J.P., Ruderman N.B. 2000: Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am. J. Physiol.* 279(2): E259-E265.
25. Cimmino M., Bukowiecki L.J. i Geloen A. 1997: In situ lipolysis measured by in vivo microdialysis during acute cold exposure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75(9): 1112-1115.
26. Coburn C.T., Knapp F.F. Jr., Febbraio M., Beets A.L., Silverstein R.L., Abumrad N.A. 2000: Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275(42): 32523-32529.
27. DeGrella R.F., Light R.J. 1980: 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(20): 9739-9745.
28. Dyck D.J., Bonen A. 1998: Muscle contraction increases palmitate esterification and oxidation and triacylglycerol oxidation. *Am. J. Physiol.* 275(5 Pt 1): E888-E896.
29. Dyck D.J., Miskovic D., Code L., Luiken J.J., Bonen A. 2000: Endurance training increases FFA oxidation and reduces triacylglycerol utilization in contracting rat soleus. *Am. J. Physiol.* 278(5): E778-E785.
30. Dyck D.J., Peters S.J., Glatz J., Gorski J., Keizer H., Kiens B., Liu S., Richter E.A., Spriet L.L., van der Vusse G.J., Bonen A. 1997: Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various fiber types. *Am. J. Physiol.* 272(3 Pt 1): E340-E351.
31. Eaton S., Bartlett K., Pourfarzam M. 1996: Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* 320 ( Pt 2): 345-357.
32. Florez-Duquet M., McDonald R.B. 1998: Cold-induced thermoregulation and biological aging. *Physiol. Rev.* 78(2): 339-358.
33. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. 1957: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-507.
34. Fredrikson G., Belfrage P. 1983: Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue.: *J. Biol. Chem.* 258 (23): 14253-14256.
35. Fredrikson G., Tornqvist H., Belfrage P. 1986: Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol., *BBA* 876: 288-293.
36. Gargiulo C.E., Stuhlsatz-Krouper S.M., Schaffer J.E. 1999: Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J. Lipid Res.* 40(5): 881-892.

37. Glatz J.F., Luiken J.J., van Nieuwenhoven F.A., van der Vusse G.J. 1997: Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 57(1): 3-9.
38. Glatz J.F., van der Vusse G.J. 1996: Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance., *Prog. Lipid Res.* 35(3): 243-282.
39. Glatz J.F., Veerkamp J.H. 1982: Palmitate oxidation by intact preparations of skeletal muscle. *BBA* 713(2): 230-239.
40. Gollnick P.D., Saltin B. 1988: Fuel for muscular exercise. In: *Exercise, nutrition and energy metabolism.* Macmillan Publishing Company, New York, 71-88.
41. Goodman M.N., Larsen P.R., Kaplan M.M., Aoki T.T., Young V.R., Ruderman N.B. 1980: Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am. J. Physiol.* 239(4): E277-E286.
42. Goodman M.N., Ruderman N.B. 1980: Starvation in the rat. I. Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA, and protein. *Am. J. Physiol.* 239(4): E269-E276.
43. Gordon C.J. 1990: Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 47(5): 963-991.1990
44. Goresky C.A., Stremmel W., Rose C.P., Guirguis S., Schwab A.J., Diede H.E., Ibrahim E. 1994: The capillary transport system for free fatty acids in the heart., *Circ. Res.* 74(6): 1015-1026.
45. Górecka M., Synak M., Budohoski L., Langfort J., Moskalewski S., Żernicka E. 2001: Palmitic acid uptake by the rat soleus muscle in vitro. *Biochem. Cell Biol.*79: 419-424.
46. Górski J. 1992: Muscle triglyceride metabolism during exercise. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70(1):123-131.
47. Górski J., Bonen A. 1997: Palmitate incorporation into lipids pools of contracting red and white muscles. *Mol. Cell. Biochem.* 166(1-2): 73-83.

48. Górski J., Hood D.A., Terjung R.L. 1986: Blood flow distribution in tissues of perfused rat hindlimb preparations. *Am. J. Physiol.* 25 (13): E441-E448.
49. Górski J., Kuryliszyn A., Wereszczyńska U. 1981: Effect of acute cold exposure on the mobilization of intramuscular glycogen and triglycerides in the rat. *Acta Physiol. Polonica.* 32(6): 755-759.
50. Grynberg A., Demaison L. 1996: Fatty acid oxidation in the heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28(suppl.1): S11-S17.
51. Guo Z., Jensen M.D. 1999: Blood glycerol is an important precursor for intramuscular triacylglycerol synthesis. *J. Biol. Chem.* 274(34): 23702-23706.
52. Hamilton J.A. 1998: Fatty acid transport: difficult or easy? *J. Lipid Res.* 39: 467-481.
53. Harmon C.M., Abumrad N.A. 1993: Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids. *J. Membr. Biol.* 133(1): 43-49.
54. Harmon C.M., Luce P., Beth A.H., Abumrad N.A. 1991: Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *J. Membr. Biol.* 121(3): 261-268.
55. Harris R.C., Hultman E., Nordesjo L.O. 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. *Scandinavian J. Clin. Laboratory Invest.* 33(2): 109-120.
56. Hartman M.L., Veldhuis J.D., Johnson M.L., Lee M., Alberti K.G., Samojlik E., Thorner M.O. 1992: Augmented growth hormone (GH) secretory burst frequency and amplitude mediate enhanced GH secretion during a two-day fast in normal men. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 757-765.

57. Horie T., Mizuma T., Kasai S., Awazu S. 1988: Conformational change in plasma albumin due to interaction with isolated rat hepatocyte. *Am. J. Physiol.* 254(4 Pt 1): G465-G470.
58. Hui T.Y., Frohnert B.I., Smith A.J., Schaffer J.E., Bernlohr D.A. 1998: Characterization of the murine fatty acid transport protein gene and its insulin response sequence. *J. Biol. Chem.* 273(42): 27420-27429.
59. Hutter J.F., Piper H.M., Spieckermann P.G. 1984: Myocardial fatty acid oxidation: evidence for an albumin-receptor-mediated membrane transfer of fatty acids. *Basic Res. Cardiol.* 79(3): 274-282.
60. Ibrahimi A., Bonen A., Blinn W.D., Hajri T., Li X., Zhong K., Cameron R., Abumrad N.A. 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.* 274(38): 26761-26766.
61. Jansky L. 1998: Shivering. w: *Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation.*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore: 47-61.
62. Jaromowska M., Górski J. 1985: Effect of fasting on skeletal muscle triglyceride content. *Experientia.* 41(3): 357-358.
63. Kamp F., Hamilton J.A. 1992: pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89(23): 11367-11370.
64. Kamp F., Hamilton J.A. 1993: Movement of fatty acids, fatty acid analogues, and bile acids across phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 32(41): 11074-11086.
65. Kamp F., Zakim D., Zhang F., Noy N., Hamilton J.A. 1995: Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. *Biochemistry.* 34(37): 11928-11937.



66. Kiens B., Kristiansen S., Jensen P., Richter E.A., Turcotte L.P. 1997: Membrane associated fatty acid binding protein (FABPpm) in human skeletal muscle is increased by endurance training., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231(2): 463-465.
67. Klein S., Sakurai Y., Romijn J.A., Carroll R.M. 1993: Progressive alterations in lipid and glucose metabolism during short-term fasting in young adult men. *Am. J. Physiol.* 265(5 Pt 1): E801-E806.
68. Klein S., Coyle E.F., Wolfe R.R. 1994: Fat metabolism during low-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. *Am. J. Physiol.* 267 (6 Pt 1): E934-940.
69. Koubi H.E., Desplanches D., Gabrielle C., Cottet-Emard J.M., Sempore B. i Favier R.J. 1991: Exercise endurance and fuel utilization: a reevaluation of the effects of fasting. *J. Appl. Physiol.* 70(3): 1337-1343.
70. Kozłowski S., Nazar K., Kaciuba-Uściłko H. 1999: Fizjologia wysiłków fizycznych. W Wprowadzenie do fizjologii klinicznej. PZWL, Warszawa, 169-332.
71. 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.
72. Langfort J., Ploug T., Ihlemann J., Saldo M., Holm C., Galbo H. 1999: Expression of hormone-sensitive lipase and its regulation by adrenaline in skeletal muscle. *Biochem. J.* 340: 459-465.
73. Langin D., Holm C., Lafontan M. 1996: Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutrition Soc.* 55(1B): 93-109.
74. Larkin L.M., Horwitz B.A., McDonald R.B. 1992: Effect of cold on serum substrate and glycogen concentration in young and old Fischer 344 rats. *Experimental Gerontology.* 27(2): 179-190.

75. Lin B., Coughlin S., Pilch P.F. 1998: Bidirectional regulation of uncoupling protein-3 and GLUT-4 mRNA in skeletal muscle by cold. *Am. J. Physiol.* 275(3 Pt 1): E386-E391.
76. Luiken J.J., Schaap F.G., van Nieuwenhoven F.A., van der Vusse G.J., Bonen A., Glatz J.F. 1999(a): Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids.* 34 Suppl: S169-S175.
77. Luiken J.J., Turcotte L.P., Bonen A. 1999(b): Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *J. Lipid Res.* 40(6): 1007-1016.
78. Luiken J.J., van Nieuwenhoven F.A., America G., van der Vusse G.J., Glatz J.F. 1997: Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins. *J. Lipid Res.* 38(4): 745-758.
79. Mangold H.K. 1969: *Thin Layer Chromatography.* (Springer, New York): 363-421.
80. Mantha L., Deshaies Y. 1998: beta-Adrenergic modulation of triglyceridemia under increased energy expenditure. *Am. J. Physiol.* 274(6 Pt 2): R1769-R1776.
81. Martineau L., Jacobs I. 1988: Muscle glycogen utilization during shivering thermogenesis in humans. *J. Appl. Physiol.* 65(5): 2046-2050.
82. Masaki T., Yoshimatsu H., Chiba S., Sakata T. 2000: Impaired response of UCP family to cold exposure in diabetic (db/db) mice. *Am. J. Physiol.* 279(4): R1305-R1309.
83. Masoro E.J. 1967: Skeletal muscle lipids. 3. Analysis of the functioning of skeletal muscle lipids during fasting. *J. Biol. Chem.* 242(6): 1111-1114.
84. Massey J.B., Bick D.H., Pownall H.J. 1997: Spontaneous transfer of monoacyl amphiphiles between lipid and protein surfaces. *Biophys. J.* 72(4): 1732-1743.

85. Memon R.A., Feingold K.R., Moser A.H., Fuller J., Grunfeld C. 1998: Am. J. Physiol. 274(2 Pt 1): E210-E217.
86. Merrill G.F., Kurth E.J., Rasmussen B.B., Winder W.W. 1998: Influence of malonyl-CoA and palmitate concentration on rate of palmitate oxidation in rat muscle. J. Appl. Physiol. 85(5): 1909-1914.
87. Miller W.C., Oscai L.B. 1984: Relationship between type L hormone-sensitive lipase and endogenous triacylglycerol in rat heart. Am. J. Physiol. 247(4 Pt 2): R621-R625.
88. Minaire Y., Vincent-Falquet J.C., Pernod A., Chatonnet J. 1973: Energy supply in acute cold-exposed dogs. J. Appl. Physiol. 35(1): 51-57.
89. Moller N., Jorgensen J.O., Alberti K.G., Flyvbjerg A., Schmitz O. 1990: Short-term effects of growth hormone on fuel metabolism and regional substrate metabolism in normal man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 70: 1179-1186.
90. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W. 1998: Biochemia Harpera, Wyd. IV, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
91. Norrelund H., Nair K.S., Jorgensen J.O., Christiansen J.S., Moller N. 2001: The protein-retaining effects of growth hormone during fasting involve inhibition of muscle-protein breakdown. Diabetes. 50(1): 96-104.
92. Noy N., Donnelly T.M., Zakim D. 1986: Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver. Biochemistry 25(8): 2013-2021.
93. Okano G., Shimojo T. 1982: Utilization of long-chain free fatty acids in white and red muscle of rats. BBA 710(2): 122-127.
94. Paris S., Samuel D., Romey G., Ailhaud G. 1979: Uptake of fatty acids by cultured cardiac cells from chick embryo: evidence for a facilitation process without energy dependence. Biochimie 61(3): 361-367.

95. Rasmussen B.B., Winder W.W. 1997: Effect of exercise intensity on skeletal muscle malonyl-CoA and acetyl-CoA carboxylase. *Journal of Applied Physiology*. 83(4): 1104-1109
96. Rauch B., Bode C., Piper H.M., Hutter J.F., 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(2): 159-166.
97. Reimer F., Löffler G., Hennig G., Wieland O.H. 1975: The influence of insulin on glucose and fatty acid metabolism in the isolated perfused rat hind quarter., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356: 1055-1066.
98. Richieri G.V., Anel A., Kleinfeld A.M. 1993: Interactions of long fatty acids and albumin: determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* 32, No.29: 7574-7580.
99. Richieri G.V., Kleinfeld A.M. 1995: Unbound free fatty acid levels in human serum. *J. Lipid Res.* 36(2): 229-240.
100. Robinson J., Newsholme E.A. 1967: Glycerol kinase activity in rat heart and adipose tissue., *Bioch. J.* 104: 2c-4c.
101. Romijn J.A., Coyle E.F., Sidosis L.S., Gastaldelli A., Horovitz J.F., Endert E., Wolfe R.R. 1993: Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am. J. Physiol.* 265 (28): E380-E391.
102. Romijn J.A., Coyle E.F., Sidosis L.S., Zhang X.J., Wolfe R.R. 1995: Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise., *J. Appl. Physiol.* 79(6): 1939-1945.
103. Rose H., Conventz M., Fischer Y., Jungling E., Hennecke T., Kammermeier H. 1994: Long-chain fatty acid-binding to albumin: re-evaluation with directly measured concentrations. *BBA* 1215(3): 321-326.

104. 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(8): 883-892.
105. Ruderman N.B., Houghton C.R., Hems R. 1971: Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism. *Biochemical J.* 124(3): 639-651.
106. Ruderman N.B., Saha A.K., Vavvas D., Witters L.A. 1999: Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 276(1 Pt 1): E1-E18.
107. Samra J.S., Clark M.L., Humphreys S.M., Macdonald I.A., Frayn K.N. 1996: Regulation of lipid metabolism in adipose tissue during early starvation. *Am. J. Physiol.* 271(3 Pt 1): E541-E546.
108. Schaffer J.E., Lodish H.F. 1994: Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79(3): 427-436.
109. Schmider W., Fahr A., Voges R., Gerok W., Kurz G. 1996: Irreversible inhibition of fatty acid salt uptake by photoaffinity labeling with 11,11-azistearate. *J. Lipid Res.* 37: 739-753.
110. Schnitzer J.E., 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(8): 6072-6082.
111. Schnitzer J.E., Sung A., Horvat R., Bravo J. 1992: Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism. *J. Biol. Chem.* 34: 24544-24553.
112. Shibata H., Perusse F., Vallerand A., Bukowiecki L.J. 1989: Cold exposure reverses inhibitory effects of fasting on peripheral glucose uptake in rats. *Am. J. Physiol.* 257(1 Pt 2): R96-R101.

113. Shimizu S., Tani Y., Yamada H., Tabata M., Murachi T. 1980: Enzymatic determination of serum-free fatty acids: a colorimetric method. *Analytical Biochemistry*. 107(1):193-198.
114. Sidossis L.S., Stuart C.A., Shulman G.I., Lopaschuk G.D., Wolfe R.R. 1996: Glucose plus insulin regulate fat oxidation by controlling the rate of fatty acid entry into the mitochondria. *J. Clin. Invest.* 98(10): 2244-2250.
115. Smith O.L. 1984: Insulin response in rats acutely exposed to cold. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62(8): 924-927.
116. Smith O.L., Davidson S.B. 1982: Shivering thermogenesis and glucose uptake by muscles of normal or diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 242(1): R109-R115.
117. Sorrentino D., Stump D., Potter B.J., Robinson R.B., White R., Kiang C.L., Berk P.D. 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(3): 928-935.
118. Sorrentino D., Stump D.D., Van Ness K., Simard A., Schwab A.J., Zhou S.L., Goresky C.A., Berk P.D. 1996: Oleate uptake by isolated hepatocytes and the perfused rat liver is competitively inhibited by palmitate. *Am. J. Physiol.* 270(2 Pt 1): G385-G392.
119. Sorrentino D., Van Ness K., Moukabary K., Berk P.D. 1991: Hepatocellular  $^{22}\text{Na}^+$  uptake: effect of oleate. *Am. J. Physiol.* 261(6 Pt 1): G1024-G2029.
120. Spector A.A., Fletcher J.E., Ashbrook J.D. 1971: Analysis of long-chain free fatty acid binding to bovine serum albumin by determination of stepwise equilibrium constants. *Biochemistry*. 10(17): 3229-3232.
121. Steffens A.B., Damsma G., van der Gugten J., Luiten P.G. 1984: Circulating free fatty acids, insulin, and glucose during chemical stimulation of hypothalamus in rats. *Am. J. Physiol.* 247(6 Pt 1): E765-E771.

fatty acid-binding

122. Stremmel W., Berk P.D. 1986: Hepatocellular influx of [14C]oleate reflects membrane transport rather than intracellular metabolism or binding. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83(10): 3086-3090.
123. Stremmel W., Diede H.E. 1989: Fatty acid uptake by human hepatoma cell lines represents a carrier-mediated uptake process. BBA 1013(3): 218-222.
124. Stremmel W., Strohmeyer G., Berk P.D. 1986: Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83(11): 3584-3588.
125. Stremmel W., Strohmeyer G., Borchard F., Kochwa S., Berk P.D. 1985: Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 82(1): 4-8.
126. Stremmel W., Theilmann L. 1986: Selective inhibition of long-chain fatty acid uptake in short-term cultured rat hepatocytes by an antibody to the rat liver plasma membrane fatty acid-binding protein. Biochim. Biophys. Acta 877(1): 191-197.
127. Stuhlsatz-Krouper S.M., Bennett N.E., Schaffer J.E. 1998: Substitution of alanine for serine 250 in the murine fatty acid transport protein inhibits long chain fatty acid transport. J. Biol. Chem. 273(44): 28642-28650.
128. Stump D.D., Nunes R.M., Sorrentino D, Berk P.D. 1992: Characteristics of oleate binding to liver plasma membrane and its uptake by isolated hepatocytes. J. Hepatol. 16: 304-315.
129. Synak M., Budohoski L. 2000: Mechanisms for tissue transport of fatty acids. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 54(6): 797-818.
130. Tanaka T., Kawamura K. 1995: Isolation of myocardial membrane long-chain fatty acid-binding protein: homology with a rat membrane protein

- implicated in the binding or transport of long-chain fatty acids. *J. Mol. Cell. Biol.* 27(8): 1613-1622.
131. Trigatti B.L., Gerber G.E. 1995: A direct role for serum albumin in the cellular uptake of long-chain fatty acids. *Biochem. J.* 308 ( Pt 1):155-159.
132. Trumble G.E., Smith M.A., Winder W.W. 1995: Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *Eur. J. Biochemistry.* 231(1):192-198.
133. Turcotte L.P. 1998: Fatty acid binding proteins and muscle lipid metabolism. In: *Biochemistry of exercise*. Ed. Hargreaves M. Human Kinetics Publishers, Inc. New York: 201-215.
134. Turcotte L.P., Hespel P., Richter E.A. 1995: Circulating palmitate uptake and oxidation are not altered by glycogen depletion in contracting skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 78(4): 1266-1272.
135. Turcotte L.P., Kiens B., Richter E.A. 1991: Saturation kinetics of palmitate uptake in perfused skeletal muscle. *FEBS Lett.* 279(2): 327-329.
136. Turcotte L.P., Petry C., Kiens B., Richter E.A. 1998: Contraction-induced increase in Vmax of palmitate uptake and oxidation in perfused skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 84(5): 1788-1794.
137. Turcotte L.P., Srivastava A.K., Chiasson J.L. 1997: Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FABP(PM)) in red skeletal muscle., *Mol. Cell. Biochem.* 166(1-2): 153-158.
138. Vallerand A.L., Jacobs I. 1989: Rates of energy substrates utilization during human cold exposure. *Eur. J. Appl. Physiol. Occupational Physiol.* 58(8): 873-878.
139. Vallerand A.L., Zamecnik J., Jones P.J., Jacobs I. 1999: Cold stress increases lipolysis, FFA Ra and TG/FFA cycling in humans. *Aviat. Space Environ. Med.* 70(1): 42-50.



140. Vallerand A.L., Lupien J. i Bukowiecki L.J. 1983: Interactions of cold exposure and starvation on glucose tolerance and insulin response. *Am. J. Physiol.* 245(6): E575-E581.
141. Vallerand A.L., Perusse F. i Bukowiecki L.J. 1990: Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *Am. J. Physiol.* 259(5 Pt 2): R1043-R1049.
142. Van der Lee K.A., Willemsen P.H., Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G., Pelsers M.M., Glatz J.F., Van der Vusse G.J. I Van Bilsen M. 2001: Fasting-induced changes in the expression of genes controlling substrate metabolism in the rat heart. *J. Lipid Res.* 42(11):1752-1758.
143. Van der Vusse G.J., Glatz J.F.C., Stam H.C.G. , Reneman R.S. 1992: Fatty acid homeostasis in normoxic and ischemic heart. *Physiol. Rev.* 72, 881-940.
144. Van der Vusse G.J., Glatz J.F.C., Van Nieuwenhoven F.A., Reneman R.S., Bassingthwaighte J.B. 1998: Transport of long-chain fatty acids across the muscular endothelium. In: *Skeletal muscle metabolism in exercise and diabets*. Plenum Press, New York, 181-191.
145. Van der Vusse G.J., Reneman R.S. 1996: Lipid metabolism in muscle. In: *Handbook of Physiology*. Oxford Press, New York, 952-994.
146. Van der Vusse G.J., Roemen T.H. 1995: Gradient of fatty acids from blood plasma to skeletal muscle in dogs. *J. Appl. Physiol.* 78(5): 1839-1843.
147. Van Nieuwenhoven F.A., Luiken J.J., De Jong Y.F., Grimaldi P.A., Van der Vusse G.J., Glatz J.F. 1998: Stable transfection of fatty acid translocase (CD36) in a rat heart muscle cell line (H9c2). *J. Lipid Res.* 39(10): 2039-2047.
148. Van Nieuwenhoven F.A., Verstijnen C.P., Abumrad N.A., Willemsen P.H., Van Eys G.J., Van der Vusse G.J., Glatz J.F. 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(2): 747-752.
149. Van Nieuwenhoven F.A., Willemsen P.H., van der Vusse G.J., Glatz J.F. 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(3-4): 489-498.
150. Vyska K., Stremmel W., Meyer W., Notohamiprodjo G., Minami K., Meyer H., Korfer R. 1994: Effects of temperature and sodium on myocardial and hepatocellular fatty acid uptake. *Circ. Res.* 74(1): 1-13.
151. Watford M. 2000: Functional glycerol kinase activity and the possibility of a major role for glyceroneogenesis in mammalian skeletal muscle. *Nutrition Rev.* 58(5): 145-148.
152. Webber J., Macdonald I.A. 1994: The cardiovascular, metabolic and hormonal changes accompanying acute starvation in men and women. *British J. Nutrition.* 71(3): 437-447.
153. 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.
154. Wilschut J., Scholma J., Eastman S.J., Hope M.J., Cullis P.R. 1992: Ca(2+)-induced fusion of phospholipid vesicles containing free fatty acids: modulation by transmembrane pH gradients. *Biochemistry* 31(10): 2629-2636.
155. Winder W.W., MacLean P.S., Lucas J.C., Fernley J.E., Trumble G.E. 1995: Effect of fasting and refeeding on acetyl-CoA carboxylase in rat hindlimb muscle. *J. Appl. Physiol.* 78(2): 578-582.
156. Yeaman S.J. 1990: Hormone-sensitive lipase - a multipurpose enzyme in lipid metabolism., *BBA* 1052: 128-132.

157. Young M.E., Goodwin G.W., Ying J., Guthrie P., Wilson C.R., Laws F.A., Taegtmeier H. 2001: Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl-CoA decarboxylase by fatty acids. *Am. J. Physiol.* 280(3): E471-E479.
158. Zakim D. 1996: Fatty acids enter cells by simple diffusion., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212(1): 5-14.
159. Zhang F., Kamp F., Hamilton J.A. 1996: Dissociation of long and very long chain fatty acids from phospholipid bilayers. *Biochemistry* 35(50): 16055-16060.
160. Zhou S.L., Potter B.J., Stump D., Sorrentino D., Berk P.D. 1990: Quantitation of plasma membrane fatty acid-binding protein by enzyme dilution and monoclonal antibody based immunoassay. *Mol. Cell. Biochem.* 98(1-2): 183-189.
161. Zhou S.L., Stump D., Kiang C.L., Isola L.M., Berk P.D. 1995: Mitochondrial aspartate aminotransferase expressed on the surface of 3T3-L1 adipocytes mediates saturable fatty acid uptake. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208(3): 263-270.