

**Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ, ΤΗΣ
ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΣΕΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΣΦΙΓΓΟΜΥΕΛΙΝΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ ΜΥΟΣ
ΕΠΙΜΥΩΝ**

της
Χρύσας Κ. Αργυρού

Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική ολοκλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

2004
Θεσσαλονίκη

Εγκεκριμένη από το Καθηγητικό σώμα:

1ος επιβλέπων : Βασίλης Μούγιος, αναπληρωτής καθηγητής

2ος επιβλέπων: Παντελής Αρζόγλου, αναπληρωτής καθηγητής

3ος επιβλέπων: Σπύρος Ζλατάνος, επίκουρος καθηγητής

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Χρύσα Κ. Αργυρού

Η σύσταση σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλοχολίνης, της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, της φωσφατιδυλοσερίνης και της σφιγγομυελίνης των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μυός επιμύων

(Υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή, Βασίλη Μούγιου)

Τα τελευταία χρόνια έχει εμφανιστεί μια πληθώρα εργασιών που μελετούν την επίδραση της άσκησης στο προφίλ λιπαρών οξέων των ζωϊκών ιστών. Στη συντριπτική πλειονότητά τους, η ανάλυση λιπαρών οξέων έχει γίνει σε ολόκληρους ιστούς και, σε ό,τι αφορά τα φωσφολιπίδια, χωρίς διαχωρισμό των ειδών τους. Καμία μελέτη δεν έχει αναλύσει το προφίλ λιπαρών οξέων στα επιμέρους φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων σκελετικού μυός είτε σε ζώα είτε στον άνθρωπο. Συνεπώς, σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο χαρακτηρισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλοχολίνης, της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, της φωσφατιδυλοσερίνης και της σφιγγομυελίνης των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μυός επιμύων. Ο μυς αυτός αφαιρέθηκε από κάθε οπίσθιο άκρο δέκα αρσενικών επιμύων της φυλής Wistar. Ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού, απομάκρυνση των μυοϊνιδίων και πυρήνων με φυγοκέντρηση στα $600 \times g$ και καταβύθιση των μιτοχονδρίων με φυγοκέντρηση στα $10000 \times g$. Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν τα φωσφολιπίδια και διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η σύσταση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία και εκφράστηκε ως ποσοστιαία κατανομή. Βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων φωσφολιπιδίων σε όλα σχεδόν τα μεμονωμένα λιπαρά οξέα. Το πιο εντυπωσιακό εύρημά μας ήταν το εντελώς ξεχωριστό προφίλ της φωσφατιδυλοχολίνης σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία φωσφολιπίδια, καθώς και η ομοιότητα που παρουσίασαν στο προφίλ των λιπαρών οξέων η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη με

τη σφιγγομυελίνη. Συνοπτικά, η φωσφατιδυλοχολίνη είχε μεγάλο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 20:4ω6 και 18:2ω6), ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη είχε μεγάλο ποσοστό κορεσμένων (κυρίως 16:0 και 18:0) και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 18:1ω9). Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη είχαν κυρίως κορεσμένα λιπαρά οξέα (16:0 και 18:0). Οι τόσο έντονες διαφορές στο προφίλ λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων ενισχύουν τη σημασία των επιμέρους λιπαρών οξέων στις κυτταρικές λειτουργίες.

ABSTRACT

Chrysa K. Argyrou

Fatty acid composition of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, phosphatidylserine and sphingomyelin of mitochondria from rat gastrocnemius muscle

(Under the supervision of associate professor Vassilis Mougios)

In recent years, a wealth of studies have appeared addressing the effect of exercise on the fatty acid composition of animal tissues. In the vast majority of these studies, analysis of fatty acids has been performed in whole tissues and, as far as phospholipids are concerned, without separation into their species. No animal or human study has analyzed the fatty acid profile of individual phospholipids in skeletal muscle mitochondria. Therefore, the purpose of this study was the characterization of the fatty acid composition of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, phosphatidylserine and sphingomyelin of mitochondria from rat gastrocnemius muscle. This muscle was removed from each hind limb of ten male Wistar rats. Next, we homogenized the tissue, centrifuged the homogenate at $600 \times g$ to remove myofibrils and nuclei, and centrifuged the supernatant at $10000 \times g$ to sediment the mitochondria. Afterwards, the phospholipids were extracted and separated by thin-layer chromatography. The fatty acid composition of the phospholipids was determined by gas chromatography and expressed as percentage distribution. We found significant differences among the four phospholipids in almost all individual fatty acids. Our most impressive finding was the entirely different profile of phosphatidylcholine compared to the other three phospholipids as well as the similarity lysophosphatidylcholine and sphingomyelin showed at their fatty acid profile. Briefly, phosphatidylcholine had a high percentage of polyunsaturated fatty acids (mainly 20:4 ω 6 and 18:2 ω 6), while phosphatidylserine had a high percentage of saturated (mainly 16:0 and 18:0) and monosaturated fatty acids (mainly 18:1 ω 9).

Lysophosphatidylcholine and sphingomyelin contained mainly saturated fatty acids (16:0 and 18:0). These major differences in the fatty acid profile of phospholipids underline the importance of individual fatty acids in cellular functions.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	5
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
<i>Το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για την επίδραση της άσκησης στη σύσταση των ιστών σε φωσφολιπίδια και στη σύσταση των φωσφολιπιδίων σε λιπαρά.....</i>	9
<i>Η ενασχόληση του εργαστηρίου μας.....</i>	10
<i>Σημασία του διαχωρισμού υποκυτταρικών κλασμάτων.....</i>	11
<i>Σημασία του διαχωρισμού των επιμέρους ειδών των φωσφολιπιδίων</i>	12
<i>Δομή των λιπαρών οξέων.....</i>	12
<i>Οικογένειες λιπαρών οξέων.....</i>	14
<i>Ρόλος λιπαρών οξέων.....</i>	15
<i>Δομή των φωσφολιπιδίων.....</i>	16
<i>Βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδριακών μεμβρανών.....</i>	19
<i>Φυσιολογικός ρόλος φωσφολιπιδίων.....</i>	19
<i>Φυσιολογικός ρόλος των φωσφολιπιδίων που εξετάστηκαν.....</i>	20
<i>Επηρεασμός της λειτουργίας των μεμβρανών από τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα.....</i>	21
<i>Χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων και η πλαστικότητα τους στην άσκηση αντοχής.....</i>	22
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	25
<i>Προκαταρκτικές μεθοδολογικές παρατηρήσεις.....</i>	25
<i>Έρευνες στον άνθρωπο.....</i>	27
<i>Έρευνες σε πειραματόζωα.....</i>	28
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	31
ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	31
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	32
<i>Πειραματόζωα.....</i>	32

<i>Συλλογή μυών.....</i>	32
<i>Ομογενοποίηση.....</i>	33
<i>Απομάκρυνση μυοϊνιδίων και πυρήνων.....</i>	33
<i>Καταβύθιση μιτοχονδρίων.....</i>	33
<i>Εκχύλιση λιπιδίων.....</i>	34
<i>Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....</i>	34
<i>Αέρια χρωματογραφία.....</i>	35
<i>Στατιστική ανάλυση.....</i>	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
<i>Διατροφή.....</i>	39
<i>Αξιολόγηση τεχνικής απομόνωσης μιτοχονδρίων.....</i>	39
<i>Λιπαρά οξέα φωσφολιπιδίων.....</i>	42
<i>Φωσφολιπίδια.....</i>	49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ποσοστιαία γραμμομοριακή σύσταση της τροφής των επιμύων.....	42
Πίνακας 2. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των επιμέρους λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης, λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοσερίνης και σφιγγομυελίνης των μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μύος επίμυος	43
Πίνακας 3. Δείκτες του προφίλ λιπαρών οξέων στα τέσσερα φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μύος επιμύων	48
Πίνακας 4. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή φωσφατιδυλοχολίνης, λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοσερίνης και σφιγγομυελίνης των μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μύος επιμύων	50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1. Συντακτικοί τύποι του παλμιτικού οξέους (16:0) και του ελαϊκού οξέος (18:1ω9).....	13
Γράφημα 2α. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδυλοχολίνης.....	17
Γράφημα 2β. Σχηματική αναπαράσταση λυσοφωσφατιδυλοχολίνης.....	
Γράφημα 2γ. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδυλοσερίνης.....	17
Γράφημα 2δ. Σχηματική αναπαράσταση σφιγγομυελίνης.....	18
Γράφημα 3. Επίπεδα προσδιορισμού της σύστασης ενός ιστού σε λιπαρά οξέα.....	26

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Τυπικός διαχωρισμός φωσφολιπιδίων από μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μύος επιμύων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	40
Σχήμα 2. Τυπικό χρωματογράφημα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων προερχόμενων από φωσφολιπίδιο (φωσφατιδυλαιθανολαμίνη) μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μύος επιμύων	41
Σχήμα 3. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης	46
Σχήμα 4. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης	46
Σχήμα 5. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοσερίνης	47
Σχήμα 6. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της σφιγγομυελίνης	47

**Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ, ΤΗΣ
ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΧΟΛΙΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΟΣΕΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΣΦΙΓΓΟΜΥΕΛΙΝΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ ΜΥΟΣ
ΕΠΙΜΥΩΝ**

Το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για την επίδραση της άσκησης στη σύσταση σε είδη φωσφολιπιδίων και στη σύσταση λιπαρών οξέων των ιστών

Τα τελευταία χρόνια έχει εμφανισθεί μια πληθώρα εργασιών που μελετούν την επίδραση της άσκησης στο προφίλ των λιπαρών οξέων των ζωικών ιστών. Αυτό οφείλεται πιθανώς στη μερική διαλεύκανση του ρόλου των επιμέρους λιπαρών οξέων στη βιοχημεία και στη φυσιολογία των ζώων. Σε μοριακό επίπεδο, τα επιμέρους λιπαρά οξέα επηρεάζουν θεμελιώδεις ρυθμιστικές διαδικασίες, όπως η ομοιόσταση των ιόντων, η γονιδιακή έκφραση, η κυτταρική σηματοδότηση και η σύνθεση λιπιδικών ή προερχόμενων από λίπη σηματοδοτικών μορίων (Kogteva & Bezuglov 1998). Οι επιδράσεις αυτές μπορούν στη συνέχεια να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη φυσιολογία των ζώων. Για παράδειγμα, υπάρχουν πλέον αρκετά στοιχεία που συνδέουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη με το προφίλ των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων του σκελετικού μυός (Borkman et al. 1993).

Διακυμάνσεις στην κατανομή ενός λιπαρού οξέος, του αραχιδονικού, μεταξύ φωσφολιπιδίων και εστέρων χοληστερόλης σε διάφορους ιστούς έχουν συνδεθεί με την ανώμαλη κατανομή ενεργειακών καυσίμων που σχετίζεται με κάποιες μορφές παχυσαρκίας γενετικής αιτιολογίας (Phinney 1996), ενώ η αναλογία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στις μεμβράνες έχει συσχετιστεί θετικά με τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων (Hulbert & Else 1999).

Η επίδραση της άσκησης στη συγκέντρωση λιπιδίων διαφόρων ιστών έχει μελετηθεί εκτεταμένα (Durstine et al. 2001· Górski et al. 1990· Górski 1992 και van der Vusse & Reneman 1996). Ωστόσο, η συντριπτική πλειονότητα των μελετών αυτού του τύπου

παραβλέπει ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό όλων των κατηγοριών λιπιδίων, τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα. Οι ενώσεις μιας κατηγορίας λιπιδίων (π.χ. των φωσφολιπιδίων) αντιμετωπίζονται συνήθως ως μία οντότητα, αν και, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, γίνεται ολοένα και πιο φανερό ότι τα μεμονωμένα λιπαρά οξέα που τις απαρτίζουν διαδραματίζουν ξεχωριστούς ρόλους σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Έτσι, αρκετοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να αποκαλύψουν τις επιδράσεις της άσκησης στο προφίλ λιπαρών οξέων διάφορων κατηγοριών λιπιδίων. Οι πρώτες σχετικές αναφορές δημοσιεύθηκαν στις αρχές του 1960 και ο αριθμός τους αυξάνεται εκθετικά τα τελευταία χρόνια (οι μισές από αυτές έχουν εμφανισθεί κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας).

Η ενασχόληση του εργαστηρίου μας

Πρόσφατα εκπονήθηκε μια διδακτορική διατριβή και ήδη εκπονείται άλλη μία στο εργαστήριό μας, με κύριο θέμα την επίδραση της χρόνιας άσκησης σε τροχό στις συγκεντρώσεις των επιμέρους λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων και των τριακυλογλυκερολών διάφορων ιστών (τριών σκελετικών μυών, της καρδιάς, του ήπατος, καθώς και του υποδόριου και σπλαγγχνικού λιπώδους ιστού) και του ορού επιμύων. Οι αναλύσεις των ιστών έχουν ολοκληρωθεί και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χρόνια άσκηση τροποποίησε το προφίλ των λιπαρών οξέων όλων των ιστών που μελετήθηκαν. Έτσι η χρόνια άσκηση μπορεί να θεωρηθεί ως ένας ακόμα φυσιολογικός τροποποιητής (άλλοι τροποποιητές είναι η διατροφή και η θερμοκρασία) της σύστασης σε λιπαρά οξέα των ιστών. Επιπλέον, κρίνοντας από το μέγεθος επίδρασης και τις ποσοστιαίες διαφορές μεταξύ γυμνασμένων και αγύμναστων επιμύων, φάνηκε ότι η επίδραση της προπόνησης στο προφίλ των λιπαρών οξέων είναι σχετικά μεγάλη.

Στη συντριπτική πλειονότητα των σχετικών μελετών, συμπεριλαμβανομένων και των δικών μας, η ανάλυση των λιπαρών οξέων μετά από άσκηση έχει γίνει σε ολόκληρους ιστούς

και, σε ό,τι αφορά τα φωσφολιπίδια, χωρίς διαχωρισμό των φωσφολιπιδίων στα είδη τους (βλ. βιβλιογραφική ανασκόπηση). Όμως, ο διαχωρισμός των υποκυτταρικών κλασμάτων και των ειδών φωσφολιπιδίων ενός ιστού φαίνεται να παρέχει πολλά πλεονεκτήματα (όπως αναλύονται παρακάτω) στην αποκάλυψη των επιδράσεων της άσκησης (και οποιουδήποτε άλλου ερεθίσματος) στο προφίλ των λιπαρών οξέων των ιστών.

Σημασία του διαχωρισμού υποκυτταρικών κλασμάτων

Στις περισσότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την εξέταση της επίδρασης της άσκησης στη σύσταση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων διαφόρων ιστών, δεν έχει γίνει διαχωρισμός υποκυτταρικών κλασμάτων. Τα κύτταρα αποτελούνται από διαμερίσματα με διαφορετική σύσταση λιπιδίων και λιπαρών οξέων. Η εξέταση λοιπόν ολόκληρου του ιστού θα μπορούσε να οδηγήσει είτε σε κάλυψη των μεταβολών σε κάποιο τμήμα του κυττάρου λόγω αναίρεσής τους από μια αντίθετη μεταβολή σε κάποιο άλλο τμήμα είτε σε αδυναμία ανίχνευσης κάποιας μικρής μεταβολής σε ένα υποκυτταρικό κλάσμα. Ας πάρουμε για παράδειγμα την περίπτωση των φωσφολιπιδίων στο σκελετικό μυ. Τα φωσφολιπίδια βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στις κυτταρικές μεμβράνες, όμως στις περισσότερες μελέτες δεν έχει γίνει διάκριση μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, των μεμβρανών του σαρκοπλασματικού δικτύου, των μεμβρανών των μιτοχονδρίων κτλ. Η άσκηση αντοχής, όπως είναι γνωστό, αυξάνει τον αριθμό των μιτοχονδρίων (Hoppele & Flück 2003), γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της συνεισφοράς τους στα ολικά φωσφολιπίδια. Από τη στιγμή που οι μεμβράνες των μιτοχονδρίων διαφέρουν από τις υπόλοιπες κυτταρικές μεμβράνες, όσον αφορά στη σύσταση των λιπαρών οξέων, η άσκηση αντοχής θα μπορούσε να προκαλέσει μεταβολή της σύστασης των φωσφολιπιδίων του μυός σε λιπαρά οξέα, ενώ στην πραγματικότητα το προφίλ των λιπαρών οξέων δε θα έχει τροποποιηθεί σε καμία από τις κυτταρικές μεμβράνες. Σε αυτή την περίπτωση, λοιπόν, εξαιτίας του μη διαχωρισμού του

ιστού σε υποκυτταρικά κλάσματα, μπορεί να οδηγηθεί κανείς σε λάθος συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση της άσκησης στη σύσταση των φωσφολιπιδίων του μυός σε λιπαρά οξέα.

Σημασία του διαχωρισμού των επιμέρους ειδών των φωσφολιπιδίων

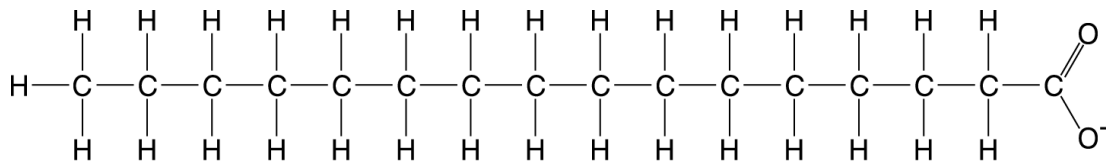
Η ανάλυση των συνολικών φωσφολιπιδίων ενός ιστού οδηγεί σε προβλήματα παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επειδή το προφίλ των λιπαρών οξέων των διαφόρων ειδών φωσφολιπιδίων είναι διαφορετικό, μία και μόνο αλλαγή που θα συνέβαινε στην ποσότητα κάποιου είδους φωσφολιπιδίου, ίσως οδηγούσε σε κάλυψη μιας διαφοροποίησης στο προφίλ κάποιου άλλου είδους ή σε εξαγωγή λανθασμένων συμπερασμάτων. Έτσι λοιπόν κρίνεται αναγκαίος και ο διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων στα είδη τους. Ο διαχωρισμός αυτός θα επιτρέψει να περιγραφούν λεπτομερειακά οι επιδράσεις της άσκησης στη σύσταση του μυός σε λιπαρά οξέα. Ο διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων στα είδη τους έχει ακόμα μεγαλύτερη αξία, αν αναλογιστεί κανείς ότι (όπως αναλύεται παρακάτω) διαφορετικά είδη φωσφολιπιδίων διαδραματίζουν διακριτούς βιολογικούς ρόλους.

Συμπερασματικά, ο διαχωρισμός υποκυτταρικών κλασμάτων και ειδών φωσφολιπιδίων αποτρέπει την εξαγωγή λανθασμένων συμπερασμάτων για την επίδραση της άσκησης στη σύσταση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων ενός ιστού και επιτρέπει την ερμηνεία των μεταβολών που παρατηρούνται πάνω σε μια πιο ρεαλιστική βάση.

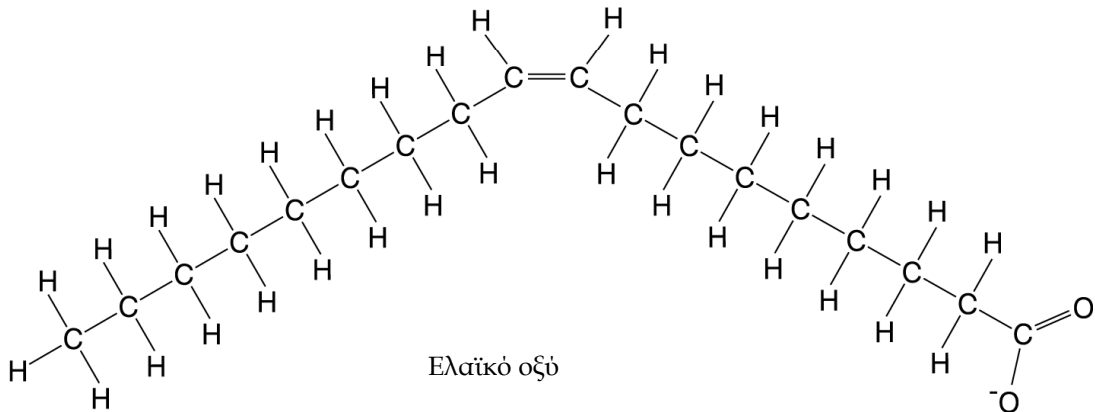
Δομή των λιπαρών οξέων

Τα λιπαρά οξέα αποτελούνται από μια ανθρακική αλυσίδα με μια καρβοξυλομάδα στην άκρη. Αναφέρονται συνήθως με τις εμπειρικές τους ονομασίες, όμως περισσότερο πληροφοριακός είναι ο αριθμητικός τους συμβολισμός που δηλώνει τον αριθμό των ατόμων άνθρακα, τον αριθμό των διπλών δεσμών και, μερικές φορές, τη θέση των διπλών δεσμών.

Για παράδειγμα, το παλμιτικό οξύ, ένα από τα πιο άφθονα λιπαρά οξέα, συμβολίζεται ως 16:0 (Γράφημα 1). Το παλμιτικό οξύ είναι κορεσμένο, αφού δεν περιέχει διπλούς δεσμούς. Το ελαϊκό οξύ, ένα άλλο άφθονο λιπαρό οξύ, είναι ακόρεστο και συγκεκριμένα μονοακόρεστο. Συμβολίζεται 18:1, αφού περιέχει ένα διπλό δεσμό (Γράφημα 1).



Παλμιτικό οξύ



Ελαϊκό οξύ

Γράφημα 1. Συντακτικοί τύποι του παλμιτικού οξέους (16:0) και του ελαϊκού οξέος (18:1ω9). Οι ιοντισμένες μορφές κυριαρχούν στα βιολογικά υγρά. Ο διπλός δεσμός στο ελαϊκό οξύ είναι διάταξης *cis*, όπως είναι οι περισσότεροι διπλοί δεσμοί στα απαντώμενα στη φύση λιπαρά οξέα.

Ο αριθμητικός συμβολισμός των ακόρεστων λιπαρών οξέων συμπληρώνεται συχνά από μια ένδειξη της θέσης των διπλών δεσμών. Η αρίθμηση ω, που δείχνει το άτομο άνθρακα μετά το οποίο εμφανίζεται ο πρώτος διπλός δεσμός, όταν κάποιος ξεκινάει την αρίθμηση από το μεθυλικό άκρο (τον ω άνθρακα δηλαδή), διευκολύνει την αναγνώριση των μεταβολικά

σχετιζόμενων λιπαρών οξέων, αφού οι αντιδράσεις επιμήκυνσης και αποδόμησης λαμβάνουν χώρα στο άλλο άκρο. Το ελαϊκό οξύ, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης ω, συμβολίζεται 18:1ω9. Το σύστημα αυτό είναι εξίσου ικανοποιητικό στην περιγραφή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, αφού οι διπλοί δεσμοί σχεδόν πάντα είναι τοποθετημένοι σε απόσταση τριών ανθράκων ο ένας από τον άλλον. Εναλλακτικά, η θέση ενός διπλού δεσμού υποδηλώνεται από ένα Δ (από τη λέξη διπλός) ακολουθούμενο από έναν ή περισσότερους αριθμούς σε θέση εκθέτη, που αντιστοιχούν στα άτομα άνθρακα μετά τα οποία εμφανίζονται οι διπλοί δεσμοί, όταν κάποιος ξεκινάει την αρίθμηση από το καρβοξυλικό άκρο. Επομένως, το ελαϊκό οξύ έχει ένα Δ⁹ δεσμό, ο οποίος εισάγεται από την καταλυτική δραστηριότητα της Δ⁹-δεσατουράσης.

Από τα πολλά λιπαρά οξέα που απαντώνται στους ζωικούς ιστούς, έξι, το 16:0, το στεατικό (18:0), το 18:1ω9, το λινελαϊκό (18:2ω6), το αραχιδονικό (20:4ω6) και το εικοσιδιεξαενοϊκό (22:6ω3), αποτελούν περίπου το 90% των λιπαρών οξέων σε όλες τις κατηγορίες λιπιδίων των ιστών.

Οικογένειες λιπαρών οξέων

Η ομαδοποίηση λιπαρών οξέων ανάλογα με τη χημική τους δομή διευκολύνει την αξιολόγηση της επίδρασης των αλλαγών τους στη φυσιολογία των οργανισμών και στην παρακολούθηση των μεταβολικών αλληλομετατροπών τους. Μεγάλες οικογένειες λιπαρών οξέων είναι τα κορεσμένα, τα μονοακόρεστα και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ενώ τα πολυακόρεστα χωρίζονται παραπέρα σε ω3 και ω6 λιπαρά οξέα. Τα ζώα δεν μπορούν να συνθέσουν ω3 και ω6 λιπαρά οξέα de novo και επομένως πρέπει να λαμβάνουν μέσω της τροφής τουλάχιστον ένα λιπαρό οξύ από κάθε κατηγορία (για αυτό το λόγο αυτά ονομάζονται απαραίτητα λιπαρά οξέα).

Ρόλος λιπαρών οξέων

Μικρό μόνο μέρος των λιπαρών οξέων ενός ιστού βρίσκεται σε ελεύθερη ή μη εστεροποιημένη μορφή. Τα περισσότερα είναι στην πραγματικότητα ακυλομάδες (προέρχονται από τα λιπαρά οξέα με την απομάκρυνση του O^- τους) των φωσφολιπιδίων, των τριακυλογλυκερολών, των μονοακυλογλυκερολών, των διακυλογλυκερολών και των εστέρων χοληστερόλης.

Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι σημαντικό καύσιμο των σκελετικών μυών, ιδιαίτερα των μυών εκείνων που περιέχουν μεγάλη αναλογία οξειδωτικών μυϊκών ινών και προέρχονται κυρίως από το πλάσμα και από την υδρόλυση των ενδοκυτταρικών τριακυλογλυκερολών.

Λιπαρά οξέα όπως το 18:3 ω 3 και το 20:4 ω 6 λειτουργούν ως πρόδρομοι τεσσάρων κατηγοριών σηματοδοτικών μορίων, των προσταγλανδινών, των προστακυκλινών, των θρομβοξανίων και των λευκοτριένιων, τα οποία όλα μαζί αποκαλούνται εικοσανοειδή. Έχει βρεθεί ότι τα φωσφολιπίδια του σκελετικού μυός των μιτοχονδρίων έχουν υψηλό ποσοστό σε 22:6 ω 3 λιπαρά οξέα και χρησιμεύουν ως δομικοί συνπαράγοντες για την λειτουργία διαφόρων μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως της ροδοψίνης, αντλίων ιόντων και συμπλεγμάτων μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Infante et al. 2001). Μύες με υψηλά ποσά μιτοχονδριακών αναπνευστικών ενζύμων θα έχουν υψηλές συγκεντρώσεις φωσφολιπιδίων με 22:6 ω 3 λιπαρά οξέα σε σύγκριση με άλλους λιγότερο δραστήριους μύες (Infante et al. 2001).

Επιπλέον, η σύσταση των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία μεταφορέων, ενζύμων και υποδοχέων (Farooqui et al.2000). Παρ' όλα αυτά τα περισσότερα δεδομένα είναι αποσπασματικά και υπάρχει μεγάλη ασυμφωνία μεταξύ τους. Το πλέον σημαντικό είναι ότι δεν μπορούμε να αποδώσουμε ένα φυσιολογικό αποτέλεσμα σε μια μόνο αλλαγή της κυτταρικής μεμβράνης γιατί μπορεί να αλλάζουν ταυτόχρονα κι άλλα πράγματα.

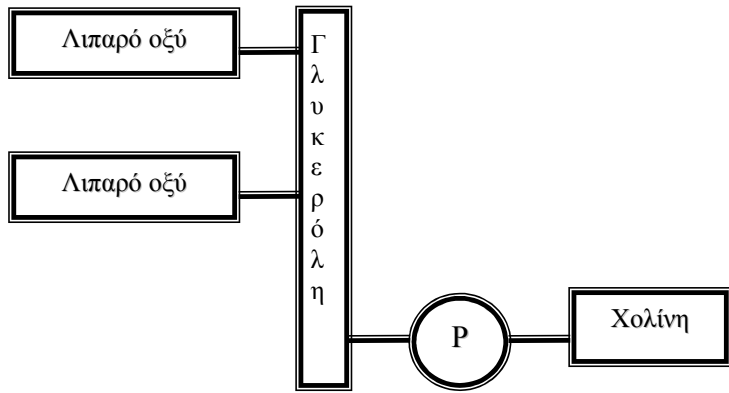
Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι, αλλαγές στη σύσταση λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, όπως μεταβολές της ποσοστιαίας κατανομής του 20:4 ω 6, μπορεί να είναι

καθοριστικής σημασίας για πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως χρόνιες καρδιαγγειακές ασθένειες και φλεγμονές (Schiller & Arnold 2002).

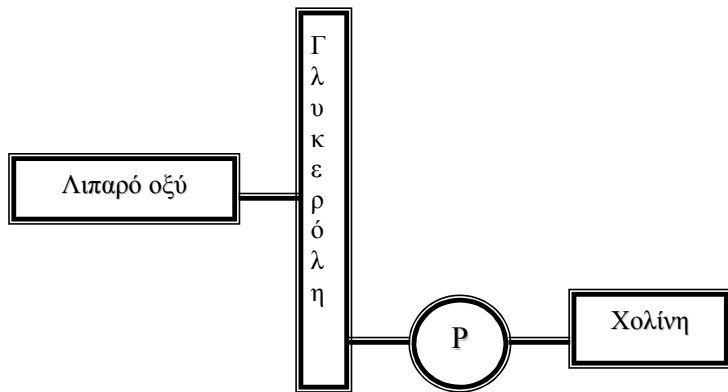
Δομή των φωσφολιπιδίων

Τα φωσφολιπίδια είναι μια κατηγορία λιπιδίων που παρουσιάζει ποικιλία δομών. Τα πιο συνηθισμένα φωσφολιπίδια έχουν έναν κορμό γλυκερόλης και ονομάζονται ειδικότερα γλυκεροφωσφολιπίδια ή φωσφογλυκερίδια. Το απλούστερο γλυκεροφωσφολιπίδιο έχει μια φωσφορική ομάδα στην ακραία θέση της γλυκερόλης και από μια ακυλομάδα στις άλλες δυο θέσεις. Ονομάζεται φωσφατιδικό οξύ και είναι η μητρική ένωση των υπόλοιπων γλυκεροφωσφολιπιδίων. Το φωσφατιδικό οξύ, αλλά και τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια, δεν είναι μια συγκεκριμένη ένωση, αλλά μια ομάδα ενώσεων, αφού οι δυο ακυλομάδες μπορεί να προέρχονται από διάφορα λιπαρά οξέα. Τα υπόλοιπα γλυκεροφωσφολιπίδια προκύπτουν από το φωσφατιδικό οξύ, όταν η φωσφορική ομάδα του συνδεθεί με την υδροξυλομάδα μιας αλκοόλης. Οι αλκοόλες που συναντάμε συχνότερα στα γλυκεροφωσφολιπίδια είναι η χολίνη, η αιθανολαμίνη, η ινοσιτόλη και η σερίνη. Τα αντίστοιχα γλυκεροφωσφολιπίδια ονομάζονται φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλινοσιτόλη και φωσφατιδυλοσερίνη. Μοναδική μεταξύ των γλυκεροφωσφολιπιδίων, από άποψη δομής, θεωρείται η καρδιολιπίνη, αφού αποτελείται από δύο φωσφατιδικά οξέα συνδεδεμένα με μία γλυκερόλη. Η σφιγγομυελίνη, ένα άλλο φωσφολιπίδιο, αποτελείται από έναν κορμό σφιγγοσίνης, στον οποίο είναι συνδεδεμένες μία ακυλομάδα και μία φωσφορική χολίνη.

Τέλος, τα λυσοφωσφολιπίδια προέρχονται από τα γλυκεροφωσφολιπίδια μετά από απόσπαση μίας από τις δύο ακυλομάδες. Έτσι η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη προέρχεται από τη φωσφατιδυλοχολίνη μετά την απομάκρυνση μίας ακυλομάδας, είτε στη θέση ένα είτε στη θέση δύο. Σχηματική αναπαράσταση των φωσφολιπιδίων που εξετάστηκαν στην παρούσα έρευνα παρουσιάζεται στο Γράφημα 2.

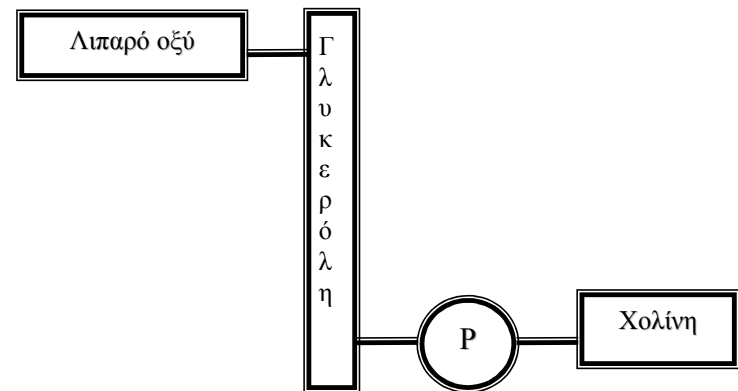


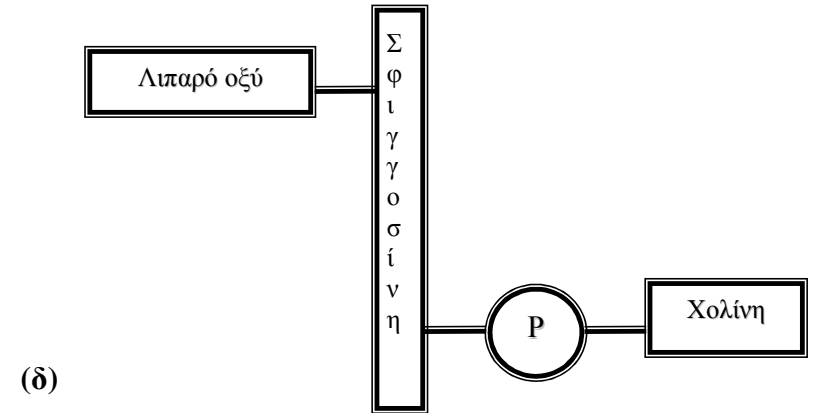
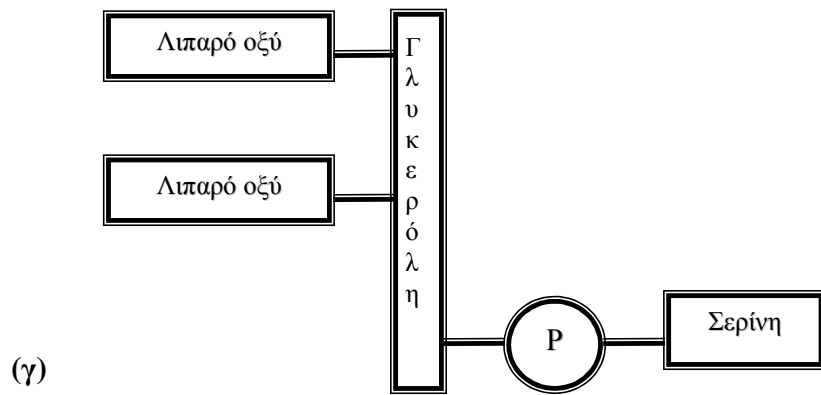
(α)



(β)

ή





Γράφημα 2. Σχηματική αναπαράσταση (α) φωσφατιδυλοχολίνης, (β) λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, (γ) φωσφατιδυλοσερίνης και (δ) σφιγγομυελίνης.

Βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδριακών μεμβρανών

Για τη σύνθεση των γλυκεροφωσφολιπιδίων απαιτείται σύνδεση φωσφατιδικού οξέος και μίας αλκοόλης. Όπως σε όλες τις αναβολικές διεργασίες, μία από τις δύο ενώσεις πρέπει να είναι ενεργοποιημένη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί και οι δύο ενώσεις να είναι ενεργοποιημένες, ανάλογα με το συγκεκριμένο φωσφολιπίδιο.

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι ξεκινά με την αντίδραση του φωσφατιδικού οξέος με την τριφωσφορική κυτιδίνη, με προϊόν την κυτιδιλοδιφωσφορική διακυλογλυκερόλη. Αυτή η αντίδραση προχωράει με τη βοήθεια της υδρόλυσης του πυροφωσφορικού οξέος.

Στη συνέχεια το ενεργοποιημένο μόριο της κυτιδιλοδιφωσφορικής διακυλογλυκερόλης, αντιδρά με την υδροξυλομάδα μίας αλκοόλης και σχηματίζεται ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός. Εάν για παράδειγμα η αλκοόλη είναι η χολίνη, τότε τα προϊόντα είναι η φωσφατιδυλοχολίνη και η μονοφωσφορική κυτιδίνη.

Τα λιπαρά οξέα, που συμμετέχουν στη σύνθεση των φωσφολιπιδίων ποικίλλουν, με αποτέλεσμα κάθε φωσφολιπίδιο να αντιπροσωπεύει μια κατηγορία μορίων παρά μία μεμονωμένη ένωση. Έτσι, ένα τυπικό ζωικό κύτταρο μπορεί να περιέχει χιλιάδες διαφορετικά φωσφολιπίδια (Berg et al. 2001). Στην πλειοψηφία τη θέση 1 της γλυκερόλης καταλαμβάνουν κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ τη θέση 2 ακόρεστα (Schiller & Arnold 2002).

Φυσιολογικός ρόλος φωσφολιπιδίων

Τα φωσφολιπίδια είναι θεμελιώδη συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και παίζουν ζωτικό ρόλο στη λειτουργία τους. Επιπρόσθετα, παρέχουν δευτερογενείς αγγελιαφόρους (όπως η διακυλογλυκερόλη και η τριφωσφορική ινοσιτόλη) που απελευθερώνονται ως ανταπόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα και μεταφέρουν πληροφορίες στο εσωτερικό του κυττάρου. Τέλος, τα φωσφολιπίδια μπορούν να παράσχουν ενέργεια με τα λιπαρά οξέα τους που απελευθερώνονται με υδρόλυση. Ωστόσο, η λειτουργία αυτή φαίνεται να είναι

δευτερεύουσας σημασίας, κρίνοντας από εργασίες που έχουν αναφέρει ότι η οξεία παρατεταμένη άσκηση γενικά δεν επηρεάζει την ποσότητα των φωσφολιπιδίων στο σκελετικό μυ (Barclay & Stainsby 1972· Fröberg & Mossfeldt 1971) και στο ήπαρ (Górski et al. 1990), ενώ τα μειώνει ελαφρά στη καρδιά (Fröberg 1971· Wójcik, Nawrocki, Chocian & Górski 1999).

Φυσιολογικός ρόλος των φωσφολιπιδίων που εξετάστηκαν

Η φωσφατιδυλοχολίνη είναι το πιο άφθονο φωσφολιπίδιο στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Εκτός από δομικό ρόλο παίζει και σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, ενώ επηρεάζει και τη δραστηριότητα πολλών μεμβρανικών ενζύμων (Choy et al. 1997). Η φωσφατιδυλοχολίνη έχει απευθείας συνδεθεί με τη σύνθεση του επιφανειοδραστικού παράγοντα του πνεύμονα, την έκκριση λιποπρωτεϊνών και την παραγωγή αραχιδονικού οξέος (20:4ω6) για τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών (Choy et al. 1997). Είναι επίσης πιθανόν η σύσταση της φωσφατιδυλοχολίνης σε λιπαρά οξέα να επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα της ινσουλίνης στον άνθρωπο (Clare et al. 1996).

Δεν είναι γνωστός κάποιος βιολογικός ρόλος της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, εκτός από το ότι συσσώρευση λυσοφωσφολιπιδίων μπορεί να οδηγήσει σε λύση των κυττάρων (Choy et al. 1997). Επιπλέον, υψηλά επίπεδα λυσοφωσφολιπιδίων κατά τη διάρκεια καρδιακής ισχαιμίας έχουν θεωρηθεί σημαντικός παράγοντας για την πρόκληση καρδιακών αρρυθμιών (Choy et al. 1997).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα η φωσφατιδυλοσερίνη μπορεί να λειτουργήσει ως πρόδρομος στη σύνθεση της φωσφατιδυλοχολίνης και της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (Voelker 2003). Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, το κύτταρο αλλάζει την κατανομή των φωσφολιπιδίων μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού φύλλου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μεταφέροντας ακαριαία φωσφατιδυλοσερίνη στο εξωτερικό φύλλο, όπου δρα ως

σήμα για αναγνώριση και απομάκρυνση του υπό θανάτωση κυττάρου με φαγοκυττάρωση (Farooqui et al. 2000).

Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε ένα διαμεμβρανικό σηματοδοτικό μονοπάτι, γνωστό ως σηματοδοτικό μονοπάτι της σφιγγομυελίνης. Στο μονοπάτι αυτό η σφιγγομυελίνη υδρολύεται από μια σφιγγομυελινάση σε φωσφορική χολίνη και κεραμίδιο. Το κεραμίδιο μπορεί κατόπιν να μετατραπεί σε σφιγγοσίνη και ένα λιπαρό οξύ από την κεραμιδάση. Το κεραμίδιο έχειδειχτεί ότι παίζει το ρόλο δευτερογενούς αγγελιαφόρου. Διάφορα ερεθίσματα, όπως η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και οι κυτοκίνες, αυξάνουν την παραγωγή κεραμιδίου. Συνεπώς, τροποποίηση των επιπέδων της σφιγγομυελίνης μπορεί να αλλάξει τα επίπεδα του κεραμιδίου και αυτό με τη σειρά του να έχει επίδραση στον κυτταρικό μεταβολισμό (Dobrzyn & Górski 2002).

Επηρεασμός της λειτουργίας των μεμβρανών από τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα

Η επίδραση της άσκησης στο προφίλ των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, ιδιαίτερα μετά τη σύνδεση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη με την ποσότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στον ανθρώπινο σκελετικό μυ (Borkman και συν. 1993). Επομένως, μια σύντομη περιγραφή της εξάρτησης της δομής και της λειτουργίας των μεμβρανών από τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα είναι απαραίτητη.

Οι μεμβράνες είναι δυναμικές κατασκευές στις οποίες οι πρωτεΐνες πλέουν σε μια θάλασσα λιπιδίων. Τα λίπη των μεμβρανών (κυρίως φωσφολιπίδια) δημιουργούν ένα φράγμα που περιορίζει τη διαπερατότητα, ενώ οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως μεταφορείς, διάλυτοι ή αντλίες και προσδίδουν στη μεμβράνη επιλεκτική διαπερατότητα. Οι φυσικές ιδιότητες μιας μεμβράνης επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση σε λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων που την απαρτίζουν. Η παρουσία κορεσμένων λιπαρών οξέων ευνοεί μια

άκαμπτη διαμόρφωση της μεμβράνης, γιατί οι ευθείες υδρογονανθρακικές αλυσίδες είναι πυκνά τοποθετημένες και συγκρατούνται με πολλούς υδρόφοβους δεσμούς. Καθώς εισάγονται *cis* διπλοί δεσμοί, οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες κάμπτονται (βλ. Γράφημα 1) και η τοποθέτηση γίνεται λιγότερο πυκνή. Ως αποτέλεσμα, οι υδρόφοβοι δεσμοί μειώνονται με την αύξηση της ακορεστότητας και οι μεμβράνες παίρνουν μια λιγότερο τακτοποιημένη, ρευστή διαμόρφωση. Η ρευστότητα των μεμβρανών εξαρτάται επίσης από το μήκος των υδρογονανθρακικών αλυσίδων (όσο μικρότερη η αλυσίδα τόσο μεγαλύτερη η ρευστότητα). Τέλος, η ρευστότητα των μεμβρανών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς επηρεάζεται και από τη χοληστερόλη, αλλά η περιγραφή του ρόλου της ξεφεύγει από το πλαίσιο της παρούσας έρευνας.

Το προφίλ λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών είναι πιθανό να καθορίζει διάφορα χαρακτηριστικά της μεμβρανικής και της κυτταρικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένης της ποσότητας και της δραστηριότητας μεμβρανικών πρωτεϊνών που ελέγχουν πολλές πλευρές της κυτταρικής λειτουργίας (Helge & Storlien 1999). Για παράδειγμα, δύο αντλίες ιόντων που συμμετέχουν στη μυϊκή συστολή, η ATPάση $\text{Na}^+\text{-K}^+$ του σαρκελήματος και η ATPάση Ca^{2+} του σαρκοπλασματικού δικτύου, είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από τη σύσταση σε λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων που τις περιβάλλουν (Murphy 1991).

Χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων και η πλαστικότητα τους στην άσκηση αντοχής

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια του κυττάρου με μέγεθος μόλις 0,5-1μm υπεύθυνα για την αποθήκευση ενέργειας μέσα στα κύτταρα με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP).

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν συστατικά μόνο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Διαθέτουν μια εξωτερική λιπιδική διπλοστιβάδα και μια εσωτερική με αναδιπλώσεις (πτυχώσεις), έτσι ώστε

τελικά κάθε μιτοχόνδριο να αποτελείται από τέσσερα μέρη: α) την εξωτερική μεμβράνη, β) το διαμεμβρανικό χώρο ανάμεσα στις δύο μεμβράνες, γ) την εσωτερική μεμβράνη με τις πολλές πτυχωσεις και δ) τη μιτοχονδριακή μήτρα (Daum & Vance 1997).

Ο αριθμός των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο ποικίλει: υπάρχουν 1700 περίπου σε κάθε ηπατικό κύτταρο. Επίσης, ποικίλει και ο όγκος που καταλαμβάνουν, ο οποίος μπορεί να φτάσει το 20-30% του συνολικού κυτταρικού όγκου (Daum & Vance 1997).

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων είναι τεράστιος, αφού συνθέτουν αδιάκοπα μόρια ATP που είναι απαραίτητα ως πηγή ενέργειας για όλες τις κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες απαιτείται κατανάλωση ενέργειας, όπως για την αντιγραφή του DNA, τη μεταγραφή DNA, τη σύνθεση πρωτεϊνών, την ενεργή μεταφορά μορίων μέσω μεμβρανών, την κυτταρική διαίρεση, τη λειτουργία του μυϊκού συστήματος κ.ά. Για τη λειτουργία τους αυτή τα μιτοχόνδρια χρειάζονται πρώτες ύλες και κυρίως σάκχαρα και λιπίδια καθώς και οξυγόνο (Daum & Vance 1997).

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν DNA, συνήθως σε κυκλική μορφή, το οποίο κωδικοποιεί και συνθέτει ορισμένες μόνο από τις πρωτεΐνες-ένζυμα που είναι απαραίτητες για τη λειτουργία τους. Από την άποψη αυτή θεωρείται ημιαυτόνομο οργανίδιο, αφού για να εκτελεί όλες τις αντιδράσεις της παραγωγής ATP χρειάζεται και ένζυμα που έχουν συντεθεί στο κυτταρόπλασμα (Daum & Vance 1997).

Τα μιτοχόνδρια πολλαπλασιάζονται μετά από διαίρεση προϋπαρχόντων μιτοχονδρίων. Δεν έχει παρατηρηθεί de novo παραγωγή τους, όπως συμβαίνει με άλλα οργανίδια.

Πολλές από τις βιοχημικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων είναι ισχυρά εξαρτημένες από τα λιπίδια και ειδικότερα από τα φωσφολιπίδια. Χαρακτηριστικό των μιτοχονδριακών μεμβρανών είναι η παρουσία καρδιολιπίνης και το μικρό ποσοστό στερολών και σφιγγομυελίνης. Τα επίπεδα φωσφατιδυλινοσιτόλης και φωσφατιδυλοσερίνης είναι χαμηλότερα, ενώ της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης υψηλότερα συγκριτικά με τις μεμβράνες

άλλων οργανιδίων ή υποκυτταρικών κλασμάτων (μικροσωμάτια, λυσοσωμάτια, πυρήνας, σύστημα Golgi). Τα πιο άφθονα φωσφολιπίδια των μιτοχονδριακών μεμβρανών, η φωσφατιδυλοχολίνη και η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, αντιπροσωπεύουν περίπου το 80% των ολικών φωσφολιπιδίων. Η καρδιολιπίνη εμφανίζεται σε ποσοστό 10-20% του συνόλου των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων (Hoppeler & Flück 2003).

Τα μιτοχόνδρια είναι τα κύρια υποκυτταρικά οργανίδια που καθορίζουν τις απαιτήσεις του μυός σε οξυγόνο. Μια από τις πιο χαρακτηριστικές προσαρμογές που συμβαίνουν στο σκελετικό μυ μετά από προπόνηση αντοχής είναι η αύξηση του σχετικού όγκου των μιτοχονδρίων του μυϊκού κυττάρου (δηλαδή του όγκου των μιτοχονδρίων ανά μυϊκή ίνα) μέχρι και 50% (Hoppeler & Flück 2003). Η μεγάλη πλαστικότητα των μιτοχονδρίων ως απάντηση σε άσκηση αντοχής και η σχετική ευκολία τεχνικών απομόνωσής τους (συγκριτικά με άλλα υποκυτταρικά κλάσματα) τα καθιστά συχνό στόχο έρευνας στην προσπάθεια αποκάλυψης των προσαρμογών που προκαλεί η άσκηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Προκαταρκτικές μεθοδολογικές παρατηρήσεις

Στη σχετική βιβλιογραφία, το μεγαλύτερο μέρος των ερευνών έχουν χρησιμοποιήσει πειραματόζωα κι όχι άνθρωπο. Τα πειραματόζωα προσφέρουν τη δυνατότητα μελέτης ιστών που είναι δύσκολο ή αδύνατο να ληφθούν από ζωντανό άνθρωπο. Ωστόσο, θα πρέπει κανείς να είναι επιφυλακτικός, όταν επιχειρεί την προεκβολή συμπερασμάτων από τα ζώα στον άνθρωπο.

Η σύσταση σε λιπαρά οξέα ενός ιστού μπορεί να προσδιοριστεί σε διάφορα επίπεδα (Γράφημα 3). Το πιο στοιχειώδες είναι η ανάλυση των ολικών λιπιδίων ενός ιστού. Είναι φανερό ότι τα δεδομένα από έναν τέτοιο τύπο ανάλυσης έχουν περιορισμένη αξία, αφού είναι αδύνατο να αποδοθούν οποιεσδήποτε διαφορές στο προφίλ λιπαρών οξέων σε κάποιο συγκεκριμένο υποκυτταρικό συστατικό ή κατηγορία λιπιδίων. Μια πιο λεπτομερής προσέγγιση είναι να διαχωριστεί ο ιστός σε υποκυτταρικά κλάσματα και να αναλυθεί η σύσταση σε λιπαρά οξέα κάθε κλάσματος. Εναλλακτικά, μπορεί να διαχωριστούν τα λιπίδια στις κατηγορίες τους και να προσδιοριστεί η σύσταση καθεμιάς σε λιπαρά οξέα.

Ενοποίηση των προηγούμενων δύο προσεγγίσεων (δηλαδή κλασματοποίηση του ιστού και διαχωρισμός των κατηγοριών λιπιδίων σε κάθε υποκυτταρικό κλάσμα) θα αποφέρει την πιο λεπτομερειακή πληροφόρηση. Η συντριπτική πλειονότητα των μελετών που θα ανασκοπηθούν έχουν υιοθετήσει μία από τις δύο ενδιάμεσες προσεγγίσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι, αν περιλαμβάνεται και ανάλυση φωσφολιπιδίων, κάποιος μπορεί να πάει ακόμα βαθύτερα, διαχωρίζοντας τα επιμέρους φωσφολιπίδια.



Γράφημα 3. Επίπεδα προσδιορισμού της σύστασης σε λιπαρά οξέα ενός ιστού.

Στις περισσότερες μελέτες τα λιπίδια έχουν απομονωθεί από ιστούς ή υποκυτταρικά κλάσματα με τη χρήση διαλύματος χλωροφόρμιου-μεθανόλης 2:1 (v/v), ενώ οι κατηγορίες λιπιδίων ή τα είδη φωσφολιπιδίων διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η ανάλυση των λιπαρών οξέων έγινε μέσω αέριας χρωματογραφίας αφού παρασκευάστηκαν οι μεθυλεστέρες τους από τα ολικά ή τα διαχωρισμένα λιπίδια με τη χρήση μιας ποικιλίας αντιδραστηρίων.

Έρευνες στον άνθρωπο

Στη βιβλιογραφία, εντοπίσαμε λίγες μελέτες, οι οποίες είχαν χρησιμοποιήσει γαστροκνήμιο μυ από άνθρωπο. Ο Bruce (1974a), μελέτησε την ποσότητα των διαφόρων ειδών φωσφολιπιδίων στο γαστροκνήμιο μυ ανθρώπων διαφορετικών ηλικιών (από εμβρυακή ηλικία έως 55 ετών). Στους ενήλικες παρατήρησε ότι η φωσφατιδυλοχολίνη αποτελεί το 47% του συνόλου, ενώ η φωσφατιδυλοσερίνη και η σφιγγομυελίνη αποτελούν το 3% και 7% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η σφιγγομυελίνη και η φωσφατιδυλοσερίνη παρουσίασαν μείωση, καθώς αυξανόταν η ηλικία, ενώ η φωσφατιδυλοχολίνη και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη παρουσίασαν ελάχιστες μεταβολές σε σχέση με την ηλικία. Σε άλλη έρευνα του ίδιου μελετητή (Bruce 1974b), μελετήθηκαν οι αλλαγές στα λιπαρά οξέα των διαφόρων ειδών φωσφολιπιδίων του γαστροκνημίου μυός του ανθρώπου σε σχέση με την ηλικία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 18:2ω6, με ποσοστό 38% στο σύνολο των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, αποτελεί το πιο άφθονο λιπαρό οξύ της φωσφατιδυλοχολίνης, ενώ στη φωσφατιδυλοσερίνη το πιο άφθονο λιπαρό οξύ είναι το 18:0 με ποσοστό 37%.

Έρευνες σε πειραματόζωα

Οι Masoro et al. (1966) χρησιμοποίησαν δείγμα γαστροκνημίου μυός, το οποίο έλαβαν από αρσενικούς πιθήκους, μετά από ηλεκτρική διέγερση διάρκειας 5 ωρών, με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση της τροποποιημένης συσταλτικής δραστηριότητας στις διάφορες κατηγορίες φωσφολιπιδίων. Η έρευνα αυτή έδειξε ότι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη και η σφιγγομυελίνη στο γαστροκνήμιο μυ, σε κατάσταση ηρεμίας, ήταν 54, 4 και 3% του συνόλου των φωσφολιπιδίων, αντίστοιχα. Επίσης φάνηκε ότι η άσκηση δεν επηρέασε την ποσότητα των διαφόρων ειδών των φωσφολιπιδίων του μυός, γεγονός που οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι ακόμη και μετά από παρατεταμένη περίοδο άσκησης τα φωσφολιπίδια του μυός δε χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής.

Έρευνα από το ίδιο εργαστήριο (Masoro 1967) παρουσίασε την επίδραση της παρατεταμένης νηστείας στην ποσότητα των μεμονωμένων φωσφολιπιδίων του γαστροκνημίου μυός επιμύων. Η ποσότητα της φωσφατιδυλοχολίνης, της φωσφατιδυλοσερίνης και της σφιγγομυελίνης στα πειραματόζωα που είτε τράφηκαν κανονικά είτε νήστεψαν για 72 ώρες ήταν 54, 3 και 3% του συνόλου των φωσφολιπιδίων, αντίστοιχα.

Οι Patriarca et al. (1969) χρησιμοποίησαν τον ερυθρό και λευκό γαστροκνήμιο μυ επιμύων, με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση της αφαίρεσης τενόντων και νεύρων στη σύσταση των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης. Σε κανονικές συνθήκες οι ερευνητές βρήκαν ότι το 16:0 αποτελεί το 39% του συνόλου των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης, το 18:1ω9 11%, το 18:2ω6 19%, το 20:4ω6 10% και 22:6ω3 8%. Η αφαίρεση των νεύρων επηρέασε κυρίως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλοχολίνης, προκαλώντας αύξηση του 18:1ω9 και του 20:4ω6, καθώς και μείωση

του 18:2ω6 και του 22:6ω3. Αντίθετα, η αφαίρεση των τενόντων δεν προκάλεσε καμία σημαντική μεταβολή στη σύσταση των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης.

Οι Gorski et al. (1999) μελέτησαν την επίδραση χρόνιας άσκησης στα επιμέρους φωσφολιπίδια του ερυθρού και του λευκού γαστροκνημίου μυός επιμύων. Παρατήρησαν ότι ο ερυθρός γαστροκνήμιος περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα φωσφολιπιδίων σε σχέση με το λευκό γαστροκνήμιο. Αυτά είναι κατά 53% φωσφατιδυλοχολίνη, 3% φωσφατιδυλοσερίνη και 2% σφιγγομυελίνη. Παρόμοια ποσοστά επί του συνόλου των φωσφολιπιδίων καταλαμβάνουν τα παραπάνω φωσφολιπίδια και στο λευκό γαστροκνήμιο (φωσφατιδυλοχολίνη 62%, φωσφατιδυλοσερίνη 3% και σφιγγομυελίνη 2%). Η άσκηση αντοχής πρόκαλεσε σημαντική αύξηση του ποσοστού της σφιγγομυελίνης στο λευκό γαστροκνήμιο και των ολικών φωσφολιπιδίων στον ερυθρό γαστροκνήμιο. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στη φωσφατιδυλοχολίνη και τη φωσφατιδυλοσερίνη.

Οι Piotrowska et al. (2000) μελέτησαν την επίδραση της λήψης της ορμόνης τριωδοθυρονίνη (T_3) στα επίπεδα των φωσφολιπιδίων των σκελετικών μυών επιμύων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποίησαν δείγμα γαστροκνημίου μυός, λευκού και ερυθρού, από επίμυες. Η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη και η σφιγγομυελίνη αποτελούσαν το 44, 6 και 4,5% αντίστοιχα, των ολικών φωσφολιπιδίων του ερυθρού γαστροκνημίου μυός της ομάδας ελέγχου. Οι αντίστοιχες τιμές στο λευκό γαστροκνήμιο μυ ήταν 49, 6 και 5,5%. Η χορήγηση T_3 μείωσε την ποσότητα της φωσφατιδυλοσερίνης τόσο στον ερυθρό (από 6% σε 5%), όσο και στο λευκό γαστροκνήμιο μυ (από 6 σε 5%), ενώ η συγκέντρωση της σφιγγομυελίνης και της φωσφατιδυλοχολίνης δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.

Οι Dobrzyn & Gorski (2002) ερεύνησαν την επίδραση εξαντλητικής άσκησης στη σύσταση των λιπαρών οξέων του κεραμιδίου και της σφιγγομυελίνης στον ερυθρό και το λευκό γαστροκνήμιο επιμύων. Σε κατάσταση ηρεμίας η σφιγγομυελίνη στον ερυθρό γαστροκνήμιο περιείχε κυρίως 16:0 και 18:0, σε ποσοστά 24 και 46% αντίστοιχα. Στο λευκό

γαστροκνήμιο, τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 23 και 52%. Η άσκηση τροποποίησε την ποσοστιαία κατανομή πολλών λιπαρών οξέων και στα δύο είδη σκελετικού μυός.

Η μοναδική έρευνα που βρήκαμε να έχει χαρακτηρίσει τα επιμέρους φωσφολιπίδια στα μιτοχόνδρια του γαστροκνημίου μυός επιμύων ήταν αυτή των Dohm et al. (1975), οι οποίοι ερεύνησαν εάν οι αλλαγές που παρατηρούνται στη δομή και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων των μυών εξαιτίας της παρατεταμένης άσκησης, σχετίζονται με μεταβολές της σύστασης των λιπιδίων των μιτοχονδριακών μεμβρανών. Βρήκαν ότι μετά από εξαντλητική άσκηση, σε αγύμναστους επίμυες, αυξήθηκε η συνολική ποσότητα των φωσφολιπιδίων και της φωσφατιδυλογολίνης, ενώ, στα προπονημένα ζώα, μειώθηκαν τόσο τα ολικά φωσφολιπίδια όσο και η φωσφατιδυλογολίνη. Οι μεταβολές στη σύσταση των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδριακών μεμβρανών δε φάνηκε να είναι η αιτία της αλλαγής της δομής και της λειτουργίας των μιτοχονδρίων μετά από εξαντλητική άσκηση, αφού η ποσότητα των μιτοχονδρίων και τα επίπεδα των φωσφολιπιδίων (ειδικά της καρδιολιπίνης) δε σχετίζονταν. Τέλος, η φωσφατιδυλογολίνη βρέθηκε να αποτελεί το 33% του συνόλου των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Είναι φανερό από την παραπάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση ότι καμία μελέτη δεν έχει αναλύσει το προφίλ λιπαρών οξέων στα επιμέρους φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων σκελετικού μυός είτε σε ζώα είτε στον άνθρωπο. Συνεπώς, σκοπός της προτεινόμενης έρευνας είναι ο χαρακτηρισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλοχολίνης, της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, της φωσφατιδυλοσερίνης και της σφιγγομυελίνης των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μυός επιμύων.

ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σε συνδυασμό με μια άλλη μεταπτυχιακή διατριβή (της Σοφίας Τσαλουχίδου), που μελέτησε τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια του γαστροκνημίου, η παρούσα έρευνα θα δώσει μια πλήρη εικόνα της σύστασης σε λιπαρά οξέα των μιτοχονδριακών φωσφολιπιδίων. Τα ευρήματα αυτά θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως εφαλτήριο για τη μέτρηση των παραπάνω παραμέτρων σε ιστούς προπονημένων πειραματόζωων και τη διαλεύκανση των επιδράσεων της άσκησης στο προφίλ λιπαρών οξέων των επιμέρους μιτοχονδριακών φωσφολιπιδίων.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πειραματόζωα

Η έρευνα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διατάξεις του Π.Δ. 160/91 «περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς, σε συμμόρφωση με την Οδηγία 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου». Χρησιμοποιήσαμε 10 ενήλικους άρρενες επίμυες της φυλής Wistar ηλικίας τριών μηνών. Τα πειραματόζωα διαβιούσαν ένα σε κάθε κλουβί κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία 22 °C και κύκλος φωτός-σκότους 12:12 ώρες) στις εγκαταστάσεις του ερευνητικού τμήματος του Θεαγενείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Οι επίμυες είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τυποποιημένη τροφή για τρωκτικά.

Συλλογή μυών

Τα πειραματόζωα θανατώθηκαν περίπου την ίδια ώρα της ημέρας (09:00- 11:00) με τραχηλική μετατόπιση, μετά από σύντομη αναισθησία σε γυάλα με αιθέρα. Επιλέξαμε τη μέθοδο αυτή ώστε να προκαλέσουμε ακαριαίο θάνατο χωρίς ασφυξία, για την αποφυγή αλλοιώσεων στις μεταβολικές διεργασίες του ζώου. Αμέσως μετά τη θανάτωση, αφαιρέσαμε το γαστροκνήμιο μυ, από κάθε οπίσθιο άκρο όσο το δυνατό γρηγορότερα. Απαλλάξαμε τους ιστούς από το ορατό λίπος και τα ορατά νεύρα και τους κονιορτοποιήσαμε με γουδί και γουδοχέρι μέσα σε υγρό άζωτο. Μετά την ολοκλήρωση της συλλογής τους, μεταφέραμε τα δείγματα μέσα σε ξηρό πάγο στο εργαστήριό μας, όπου τα αποθηκεύσαμε στους -80 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

Ομογενοποίηση

Ομογενοποιήσαμε 480 mg γαστροκνημίου μυός σε γυάλινο ομογενοποιητή της εταιρίας Kontes (Vineland, NJ, ΗΠΑ) με την προσθήκη 19 όγκων ισοτονικού διαλύματος 250 mmol/L σακχαρόζης, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7,3). Αφαιρέσαμε 50 μ L ομογενοποιημάτος για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και της δραστηριότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* (cytochrome *c* oxidase, CCO). Σκοπός των δύο αυτών προσδιορισμών, που έγιναν και στο μιτοχονδριακό παρασκεύασμα, ήταν η εκτίμηση του εμπλουτισμού του παρασκευάσματος σε μιτοχόνδρια, αφού η CCO εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.

Απομάκρυνση μυοϊνιδίων και πυρήνων

Μεταφέραμε το υπόλοιπο ομογενοποίημα σε σωλήνα φυγοκέντρησης και το φυγοκεντρήσαμε σε ψυχόμενο φυγοκεντρητή Sorvall RC 28S της εταιρείας Du Pont (Newtown, CT, ΗΠΑ) στα $600 \times g$ για 5 min στους 4°C. Έπειτα μεταφέραμε το υπερκείμενο υγρό σε άλλο φυγοκεντρικό σωλήνα και κάναμε έκπλυση του ιζήματος με 5 mL διαλύματος ομογενοποίησης κι επανάληψη της φυγοκέντρησης δύο φορές για τη συλλογή όσο γινόταν περισσότερων μιτοχονδρίων. Επαναλάβαμε τη μεταφορά των δύο υπερκειμένων υγρών σε άλλο φυγοκεντρικό σωλήνα.

Καταβύθιση μιτοχονδρίων

Φυγοκεντρήσαμε τα υπερκείμενα υγρά στον ίδιο φυγοκεντρητή $10,000 \times g$ για 10 min στους 4 °C. Αυτή η σχετική φυγοκεντρική δύναμη κρίθηκε ικανή για την καταβύθιση των μιτοχονδρίων μετά από πιλοτικά πειράματα. Απομακρύναμε την υπερκείμενη στιβάδα και κάναμε έκπλυση του ιζήματος με 9 mL διαλύματος ομογενοποίησης. Επαναλάβαμε τη διαδικασία αυτή δύο φορές για να καθαρίσουμε το

μιτοχονδριακό παρασκεύασμα. Στη συνέχεια διαλύσαμε το ίζημα σε 200 μL διαλύματος ομογενοποίησης στους 4°C και μεταφέραμε το μιτοχονδριακό παρασκεύασμα σε φαρδύ γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα σε τελικό όγκο 500 μL . Αφαιρέσαμε 80 μL ποσότητα για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και της CCO.

Εκχύλιση λιπιδίων

Η εκχύλιση των λιπιδίων από το παρασκεύασμα των μιτοχονδρίων ξεκίνησε με την προσθήκη 6,8 mL μείγματος χλωροφορμίου–μεθανόλης 2:1 (v/v), αφήσαμε για 5 min, προσθέσαμε 1,4 mL νερό και αναδεύσαμε ζωηρά για 1 min με σκοπό να εκχυλιστούν τα λιπίδια στην κάτω στιβάδα (Folch et al. 1957). Τέλος, φυγοκεντρήσαμε το μείγμα στα $1500 \times g$ για 5 min, μεταφέραμε την κάτω στιβάδα σε φαρδύ δοκιμαστικό σωλήνα και τη συμπυκνώσαμε με εξάτμιση κάτω από ρεύμα N_2 με ελαφριά θέρμανση (40°C).

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Ο διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων πραγματοποιήθηκε με δισδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Πρόκειται για ένα είδος χρωματογραφίας προσρόφησης, κατά την οποία ένας διαλύτης (κινητή φάση) ταξιδεύει κατά μήκος μιας λεπτής πλάκας από πορώδες υλικό. Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή της πλάκας και παρασύρεται από την κινητή φάση. Τα συστατικά του δείγματος ταξιδεύουν κατά μήκος της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα, ανάλογα με τη συνάφειά τους προς το διαλύτη, και μ' αυτόν τον τρόπο διαχωρίζονται. Επειδή ο διαχωρισμός όλων των φωσφολιπιδίων σε μια διάσταση δεν είναι ικανοποιητικός, ακολουθεί χρωματογραφία με άλλο διαλύτη σε κατεύθυνση κάθετη προς την πρώτη

Αναλυτικά, διαλύσαμε το συμπυκνωμένο εκχύλισμα σε 50 μL χλωροφόρμιου – μεθανόλης 2:1 (v/v) και ενσταλλάξαμε 10 μL στη γωνία (2,5 cm από κάθε πλευρά)μιας

πλάκας από σίλικα της εταιρείας Sigma (St. Louis, M.O, ΗΠΑ). Αναπτύξαμε την πλάκα με χλωροφόρμιο–μεθανόλη–οξικό οξύ 10:5:1 (v/v/v) για 90 min, τη στεγνώσαμε σε ρεύμα αέρα για 40 min και την αναπτύξαμε με περιστροφή κατά 90° με χλωροφόρμιο – ακετόνη – μεθανόλη – οξικό οξύ – νερό 10:4:2:2:1 (v/v/v/v/v). Μετά το πέρας και της δεύτερης ανάπτυξης, στεγνώσαμε την πλάκα όπως παραπάνω και την ψεκάσαμε με διάλυμα 0,2 % διχλωροφλουορεσεΐνης σε αιθανόλη για τον εντοπισμό των κηλίδων των φωσφολιπιδίων κάτω από υπεριώδες φως. Το παραπάνω σύστημα δισδιάστατης χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Kester et al. 1984). Για την επιβεβαίωση της θέσης των φωσφολιπιδίων ψεκάσαμε μια πλάκα χρωματογραφίας με διάλυμα 0,1 % νινυδρίνης σε αιθανόλη και τη θερμάναμε ελαφρά για 5 min. Η νινυδρίνη αντιδρά με πρωτοταγείς αμινομάδες, όπως αυτή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, παράγοντας ρόδινο χρώμα. Για την επιβεβαίωση της θέσης όλων των φωσφολιπιδίων, ψεκάσαμε στη συνέχεια την πλάκα με διάλυμα 1,3% κυανού του μολυβδαινίου (Sigma).

Αέρια χρωματογραφία

Ο προσδιορισμός των φωσφολιπιδίων έγινε μέσω της μετατροπής των ακυλομάδων τους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, οι οποίοι μετρήθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Αναλυτικά, αποξέσαμε τις κηλίδες που αντιστοιχούσαν στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, στη φωσφατιδυλινοσιτόλη και στην καρδιολιπίνη σε τρεις γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους είχαμε προσθέσει 5 μL διαλύματος δεκαπενταενοϊκού οξέος σε χλωροφόρμιο συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ως εσζτερικό πρότυπο. Προσθέσαμε 0,5 mL μεθανολικού διαλύματος μεθοξιδίου του νατρίου (Sigma) και επώασαμε στους 50° για 10 min. Κατόπιν, προσθέσαμε 0,5 mL μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βορίου (Fluka, Buchs, Ελβετία) και

επαναλάβουμε την επώαση όπως προηγουμένως (Kramer et al. 1997). Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων που παράχθηκαν εκχυλίστηκαν με προσθήκη 1,5 mL εξανίου και ζωηρή ανάδευση για 1 min. Από τις δύο στιβάδες που σχηματίστηκαν όταν αφήσαμε το δείγμα να ηρεμήσει μεταφέραμε την υπερκείμενη (που περιείχε τους μεθυλεστέρες) σε νέο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και την εξατμίσαμε κάτω από ρεύμα N₂ για τη συμπύκνωση των μεθυλεστέρων.

Η αέρια χρωματογραφία είναι ένα είδος χρωματογραφίας κατανομής, κατά την οποία τα συστατικά ενός μείγματος κατανέμονται ανάμεσα σε μια στάσιμη και μια κινητή φάση. Η στάσιμη φάση είναι υγρή και είναι προσροφημένη επάνω στο στερεό υλικό ενός μακρού και στενού σωλήνα, που ονομάζεται στήλη αέριας χρωματογραφίας. Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα σε κλίβανο με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, ο οποίος είναι το κεντρικό μέρος του αέριου χρωματογράφου. Κατά μήκος της στήλης ταξιδεύει η κινητή φάση, που είναι αέρια. Το δείγμα εισάγεται στην αρχή της στήλης και παρασύρεται από την κινητή φάση κατά μήκος της στάσιμης. Τα συστατικά του δείγματος, λόγω της διαφορετικής χημικής τους δομής, έχουν διαφορετική κατανομή μεταξύ κινητής και στάσιμης φάσης με αποτέλεσμα να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης. Η ταχύτητα αυτή εξαρτάται από την ροή της κινητής φάσης και από το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης.

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων διαχωρίστηκαν σε αέριο χρωματογράφο Hewlett Packard 5890 Series II (Waldbronn, Γερμανία) εξοπλισμένο με τριχοειδή στήλη AT-WAX μήκους 30 m από την Alltech (Deerfield, ΗΠΑ) και με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας. Η θερμοκρασία της στήλης προγραμματίστηκε από τους 160 στους 250 °C με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 5 °C/min. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ροή 1 mL/min (στους 160 °C).

Διαλύσαμε τους συμπυκνωμένους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης σε 40, 30 και 30 μL εξανίου αντίστοιχα και εισάγαμε 1, 3 και 3 μL αντίστοιχα με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης.

Κατά την έξοδό του από τη στήλη, κάθε μεθυλεστέρας καιγόταν στον ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας και το παραγόμενο ηλεκτρικό σήμα διοχετευόταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Εκεί μετατρεπόταν σε καμπύλη έντασης του σήματος ως προς το χρόνο εξόδου από τη στήλη, το ονομαζόμενο χρωματογράφημα. Σε αυτό, κάθε μεθυλεστέρας απεικονίζεται ως μία αιχμή. Το εμβαδόν κάτω από την αιχμή είναι ανάλογο της μάζας του μεθυλεστέρα και υπολογιζόταν με ολοκλήρωση από το πρόγραμμα HP 3365 ChemStation της Hewlett-Packard. Το εμβαδόν κάθε αιχμής μετατρεπόταν σε μάζα μεθυλεστέρα μετά από σύγκρισή του με το εμβαδόν της αιχμής του δεκαπεντανοϊκού μεθυλεστέρα που υπήρχε σε κάθε χρωματογράφημα, προερχόμενο από τη μεθυλίωση του εσωτερικού προτύπου.

Στη συνέχεια, η μάζα του κάθε μεθυλεστέρα, μετατρεπόταν σε μmol , διαιρώντας με το MB του. Γνωρίζοντας ότι 1 mol μεθυλεστέρα αντιστοιχεί σε 1 mol λιπαρού οξέος, η παραπάνω ποσότητα μετατραπόταν σε μmol λιπαρού οξέος. Υπολογίσαμε τη μάζα του μυός που αντιστοιχούσε στον όγκο του μιτοχονδριακού παρασκευάσματος που χρησιμοποιήσαμε για την ανάλυση και εκφράσαμε τη συγκέντρωση κάθε λιπαρού οξέος σε $\mu\text{mol/g}$ μυός.

Στη συνέχεια υπολογίσαμε τη συγκέντρωση κάθε φωσφολιπιδίου διαιρώντας το άθροισμα της συγκέντρωσης των επιμέρους λιπαρών οξέων με τον αριθμό λιπαρών οξέων στο φωσφολιπίδιο (2 για τη φωσφατιδυλοχολίνη, 1 για τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, 2 για τη φωσφατιδυλοσερίνη και 2 για τη σφιγγομυελίνη). Η συγκέντρωση μετατράπηκε στη συνέχεια σε εκατοστιαίο ποσοστό επί του συνόλου των

φωσφολιπιδίων σε συνδυασμό με τα δεδομένα από τη μεταπτυχιακή διατριβή της Τσαλουχίδου Σοφίας.

Επειδή η σύσταση των λιπιδίων των ιστών σε λιπαρά οξέα επηρεάζεται από τη σύσταση της τροφής σε λιπαρά οξέα, προσδιορίσαμε και αυτή με την προσθήκη μεθανολικού διαλύματος μεθοξειδίου του νατρίου και μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βορίου, όπως περιγράφηκε παραπάνω, σε λίγα mg της τροφής των πειραματόζωων. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία, όπως και πάλι περιγράφηκε παραπάνω.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Εξετάσαμε την κατανομή όλων των μεταβλητών με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov και βρήκαμε ότι δεν διέφερε σημαντικά από την κανονική. Για να συγκρίνουμε το ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος μεταξύ των τριών φωσφολιπιδίων, πραγματοποιήσαμε ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Για την πραγματοποίηση ζευγαρωτών συγκρίσεων, πραγματοποιήσαμε ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων. Ορίσαμε το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας στο $\alpha = 0,05$. Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήσαμε το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοση 10.0 (SPSS Inc., Chicago, ΗΠΑ).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

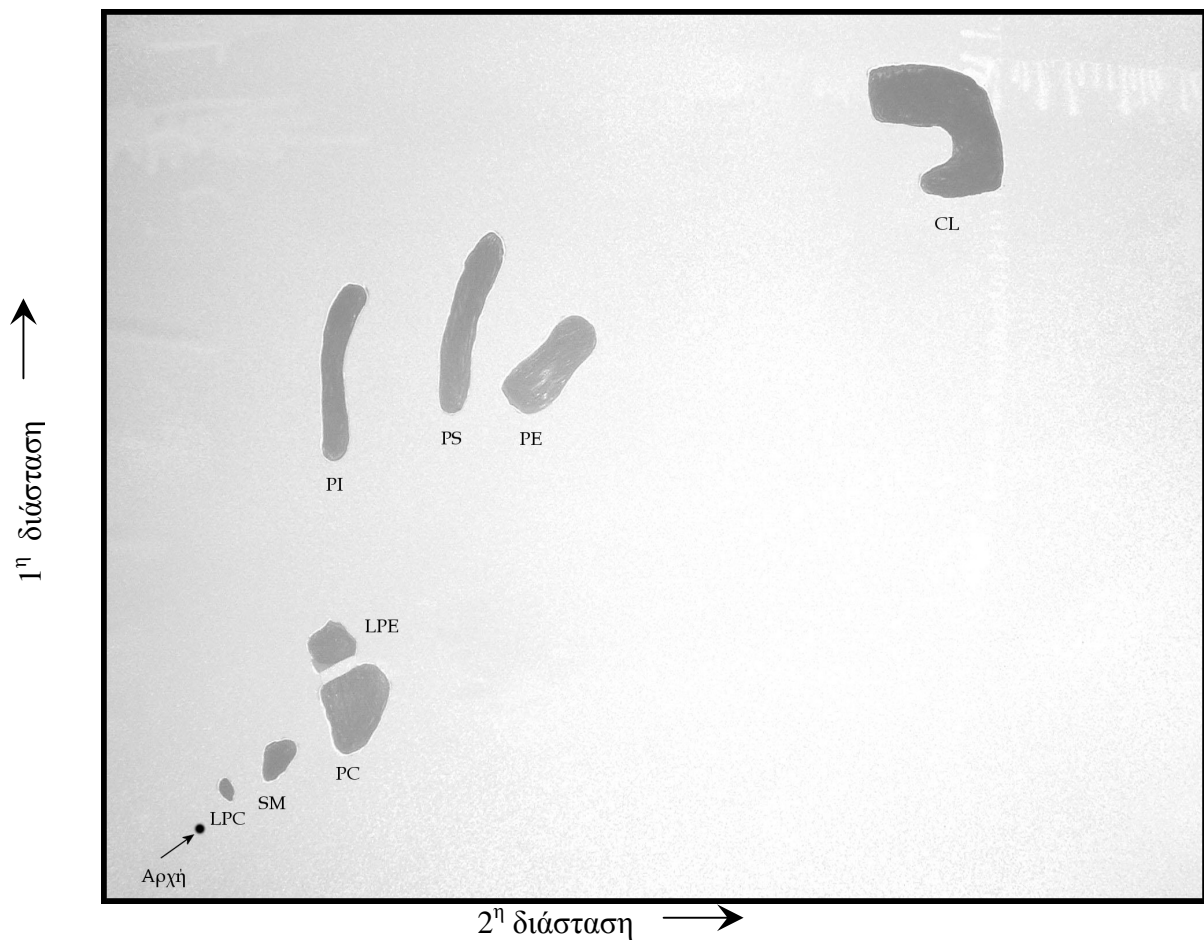
Δεκατέσσερα λιπαρά οξέα ανιχνεύθηκαν σε σημαντικές ποσότητες με την αέρια χρωματογραφία: μυριστικό (14:0), 16:0, παλμιτελαϊκό (16:1ω7), 18:0, 18:1ω9, cis-βαξενικό (18:1ω7), 18:2ω6, γ-λινελανικό (18:3ω6), α-λινελανικό (18:3ω3), γονδοϊκό (20:1ω9), διομο-γ-λινελανικό (20:3ω6), 20:4ω6, εικοσιδιπενταενοϊκό (22:5ω3) και 22:6ω3. Μια τυπική πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας παρουσιάζεται στο σχήμα 1, ενώ ένα τυπικό χρωματογράφημα των λιπαρών οξέων στο σχήμα 2.

Διατροφή

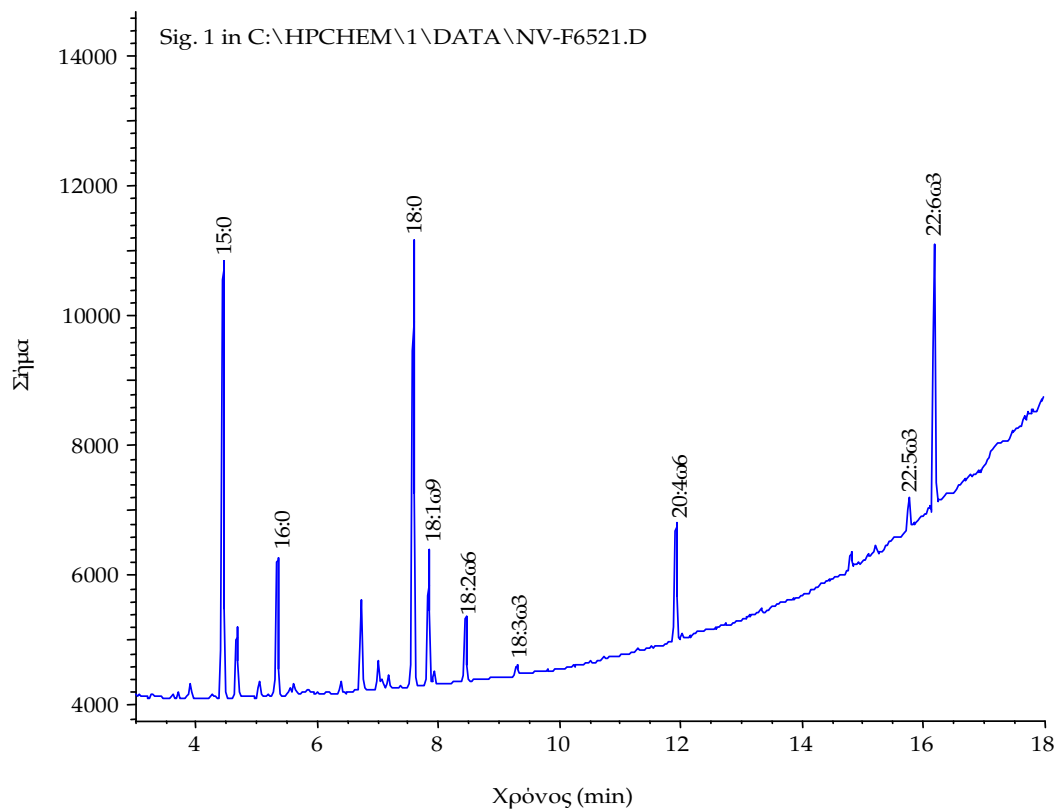
Η σύσταση σε λιπαρά οξέα της διατροφής των πειραματόζωων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Τα πιο άφθονα λιπαρά οξέα ήταν τα 18:2ω6, 18:1ω9 και 16:0, που συγκέντρωναν το 86% του συνόλου.

Αξιολόγηση της τεχνικής απομόνωσης των μιτοχονδρίων

Ο εμπλουτισμός του μιτοχονδριακού παρασκευάσματος σε CCO (δηλαδή σε μιτοχόνδρια) ως το πηλίκιο της ειδικής δραστηριότητας της CCO στα μιτοχόνδρια προς την ειδική δραστηριότητά της στον ιστό ήταν 5,8 (δεδομένα από τη διπλωματική εργασία της Ελένης Ορφανίδου).



Σχήμα 1. Τυπικός διαχωρισμός φωσφολιπιδίων από μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μύος επιμύων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. LPC: λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, SM: σφιγγομυελίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, LPE: λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη, PI: φωσφατιδυλινοσιτόλη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, PE: φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, CL: καρδιολιπίνη.



Σχήμα 2. Τυπικό χρωματογράφημα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων προερχόμενο από φωσφολιπίδιο (φωσφατιδυλαιθανολαμίνη) των μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μυός επιμύων.

Πίνακας 1. Ποσοστιαία γραμμομοριακή σύσταση των λιπαρών οξέων της τροφής των επιμύων

Λιπαρό οξύ	%
14:0	0,9
16:0	18,1
16:1ω7	0,6
18:0	4,4
18:1ω9	31,5
18:1ω7	1,2
18:2ω6	36,3
18:3ω3	1,4
20:1ω9	0,7
22:5ω3	0,3
22:6ω3	4,7
Άθροισμα	100,0

Λιπαρά οξέα φωσφολιπιδίων

Τα αποτελέσματα που αφορούν στα λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλοχολίνης, λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, φωσφατιδυλοσερίνης και σφιγγομυελίνης παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Η ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεμονωμένων λιπαρών οξέων, εκτός από τα 18:1ω9 και 22:5ω3 και στα τέσσερα φωσφολιπίδια.

Πίνακας 2. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των επιμέρους λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), λυσοφωσφατιδυλοχολίνης (LPC), φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και σφιγγομυελίνης (SM) των μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μυός επιμύων (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

Λιπαρό οξύ	PC	LPC	PS	SM
14:0	0,42 ± 0,14 ^{β,γ,δ}	2,81 ± 0,94 ^α	1,77 ± 0,82 ^{α,δ}	2,89 ± 1,20 ^{α,γ}
16:0	42,50 ± 2,39 ^{β,γ,δ}	37,79 ± 2,98 ^{α,γ}	21,48 ± 5,49 ^{α,β,δ}	35,68 ± 3,67 ^{α,γ}
16:1ω7	0,43 ± 0,12 ^{β,γ,δ}	2,71 ± 1,21 ^α	2,23 ± 1,43 ^α	3,39 ± 0,97 ^α
18:0	8,99 ± 0,98 ^{β,γ,δ}	31,65 ± 4,84 ^{α,γ}	43,78 ± 9,71 ^{α,β}	35,48 ± 2,82 ^α
18:1ω9	7,45 ± 0,80	9,07 ± 2,82	12,74 ± 8,02	7,82 ± 1,03
18:1ω7	3,71 ± 0,44 ^{β,δ}	1,07 ± 0,88 ^α	2,49 ± 3,33	0,76 ± 0,51 ^α
18:2ω6	13,98 ± 0,86 ^{β,γ,δ}	5,17 ± 2,62 ^α	3,44 ± 0,98 ^{α,δ}	4,82 ± 1,07 ^{α,γ}
18:3ω6	0,15 ± 0,05 ^δ	0,45 ± 0,40 ^δ	0,23 ± 0,18 ^δ	0 ^{α,β,γ}
18:3ω3	0,21 ± 0,06 ^{β,γ,δ}	1,28 ± 0,63 ^α	1,70 ± 0,95 ^α	1,78 ± 0,55 ^α
20:1ω9	0,14 ± 0,02 ^{β,δ}	0 ^α	0,11 ± 0,18	0 ^α
20:3ω6	0,57 ± 0,07 ^δ	1,21 ± 0,78	0,57 ± 0,48 ^δ	1,52 ± 0,61 ^{α,γ}
20:4ω6	14,22 ± 1,83 ^{β,γ,δ}	2,79 ± 2,58 ^α	2,19 ± 0,88 ^α	1,96 ± 1,55 ^α
22:5ω3	1,23 ± 0,30	0,81 ± 0,98	1,82 ± 0,88	1,07 ± 0,70
22:6ω3	6,01 ± 1,37 ^{β,δ}	3,18 ± 1,67 ^α	5,44 ± 3,46	2,84 ± 1,54 ^α
Σύνολο	100,00	100,00	100,00	100,00

^α Σημαντικά διαφορετικό από PC (P < 0,05).

^β Σημαντικά διαφορετικό από LPC (P < 0,05).

^γ Σημαντικά διαφορετικό από PS (P < 0,05).

^δ Σημαντικά διαφορετικό από M (P < 0,05).

Παρατηρούμε ότι για τη φωσφατιδυλοχολίνη τα τέσσερα αφθονότερα λιπαρά οξέα ήταν το 16:0, το 20:4ω6, το 18:2ω6 και το 18:0. Για τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη ήταν το 16:0, το 18:0, το 18:1ω9 και το 18:2ω6. Για τη φωσφατιδυλοσερίνη ήταν το 18:0, το 16:0, το 18:1ω9 και το 22:6ω3. Τέλος για τη σφιγγομυελίνη ήταν το 16:0, το 18:0, το 18:1ω9 και το 18:2ω6.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών συγκρίσεων.

Το 14:0 στη φωσφατιδυλοχολίνη ήταν σημαντικά χαμηλότερο από τα τρία άλλα φωσφολιπίδια. Σημαντικά χαμηλότερο ήταν στη φωσφατιδυλοσερίνη από τη σφιγγομυελίνη.

Το 16:0 ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλοχολίνη από τα τρία άλλα φωσφολιπίδια. Επίσης ήταν σημαντικά χαμηλότερο στη φωσφατιδυλοσερίνη από τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και τη σφιγγομυελίνη.

Το 16:1ω7 ήταν σημαντικά χαμηλότερο στη φωσφατιδυλοχολίνη συγκριτικά με τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη.

Σημαντικά χαμηλότερο ήταν και το 18:0 στη φωσφατιδυλοχολίνη από τα τρία άλλα φωσφολιπίδια. Σημαντικά υψηλότερο ήταν στη φωσφατιδυλοσερίνη συγκριτικά με τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη.

Το 18:1ω7 ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλοχολίνη συγκριτικά με τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και τη σφιγγομυελίνη.

Το 18:2ω6 ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλοχολίνη από τα τρία άλλα φωσφολιπίδια. Επίσης ήταν σημαντικά υψηλότερο στη σφιγγομυελίνη από τη φωσφατιδυλοσερίνη.

Το 18:3ω6 ήταν μη ανιχνεύσιμο στη σφιγγομυελίνη κι άρα σημαντικά χαμηλότερο συγκριτικά με τα τρία άλλα φωσφολιπίδια.

Το 18:3ω3 ήταν σημαντικά χαμηλότερο (σχεδόν μη ανιχνεύσιμο) στη φωσφατιδυλοχολίνη από τα τρία άλλα φωσφολιπίδια.

Το 20:1ω9 ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλοχολίνη από τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και τη σφιγγομυελίνη, στις οποίες δεν ανιχνεύθηκε.

Το 20:3ω6 ήταν σημαντικά υψηλότερο στη σφιγγομυελίνη από τη φωσφατιδυλοχολίνη και τη φωσφατιδυλοσερίνη.

Το 20:4ω6 ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλοχολίνη από τα τρία άλλα φωσφολιπίδια.

Τέλος, το 22:6ω3 ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλοχολίνη από τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και τη σφιγγομυελίνη.

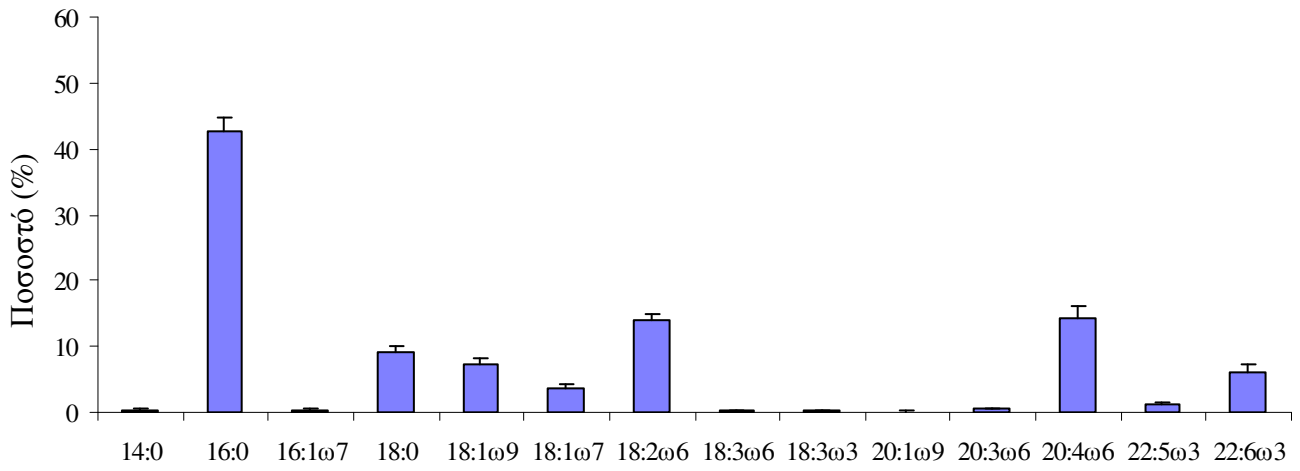
Για την καλύτερη απεικόνιση και την ευκολότερη σύγκριση της ποσοστιαίας κατανομής των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης, της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, της φωσφατιδυλοσερίνης και της σφιγγομυελίνης παρουσιάζονται τα σχήματα 3, 4, 5 και 6.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ποσοστά των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, των ω6 λιπαρών οξέων, των ω3 λιπαρών οξέων, ο λόγος ω6/ω3 λιπαρά οξέα, ο λόγος των ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά οξέα και ο δείκτης ακορεστότητας (μέσος όρος των διπλών δεσμών ανά λιπαρό οξύ πολλαπλασιαζόμενο με το 100), που μαζί με το λόγο των ακόρεστων προς τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δείχνουν τον ολικό βαθμό ακορεστότητας.

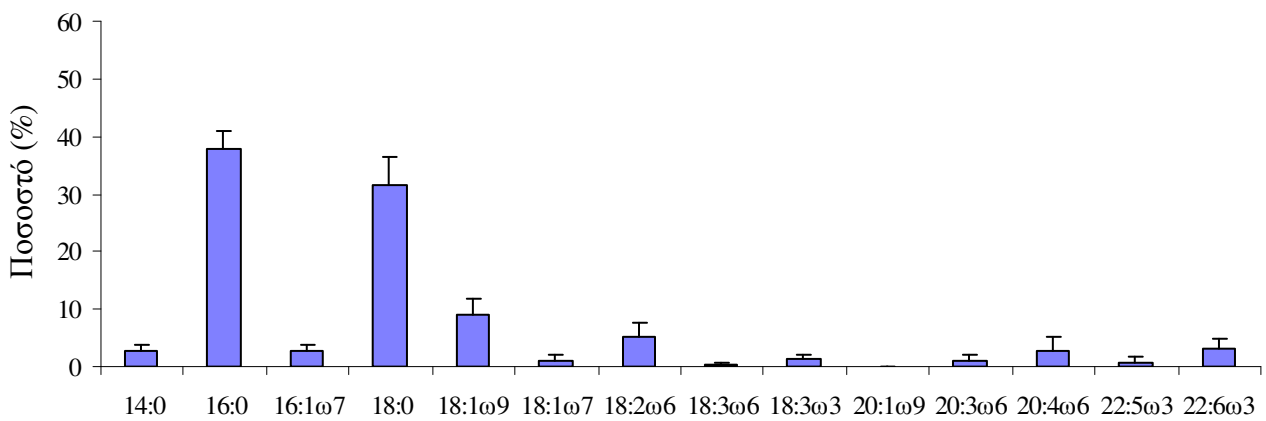
Η ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των δεικτών του προφίλ λιπαρών οξέων και στα τέσσερα φωσφολιπίδια. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών συγκρίσεων.

Το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης ήταν σημαντικά μικρότερο συγκριτικά με τα τρία άλλα φωσφολιπίδια.

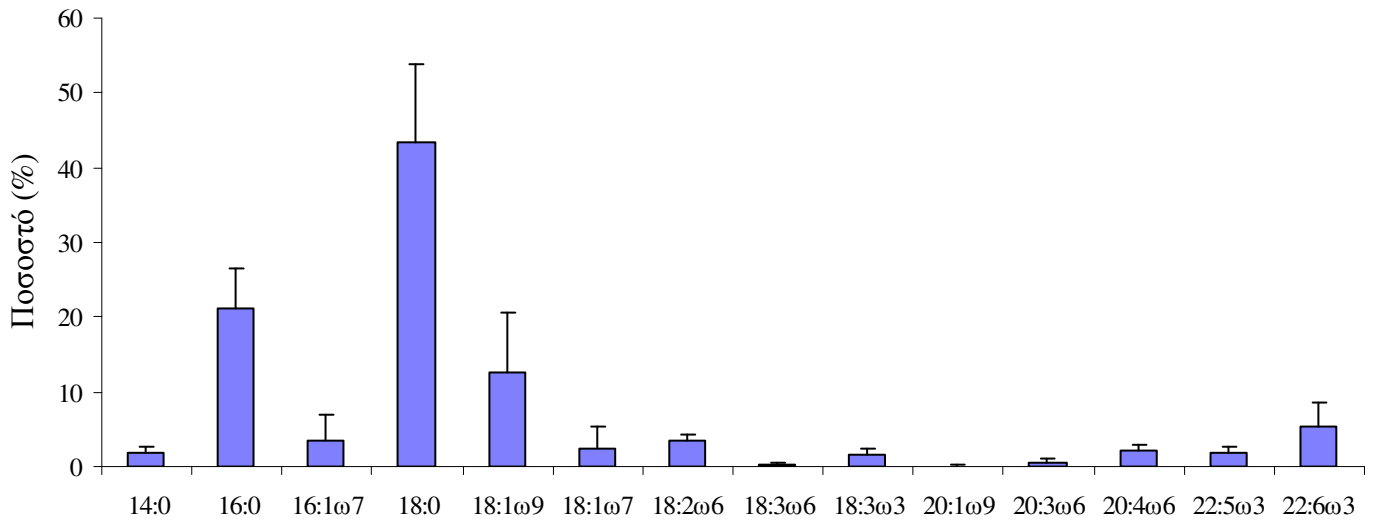
Στα πολυακόρεστα, η φωσφατιδυλοχολίνη υπερείχε έναντι των άλλων τριών φωσφολιπιδίων.



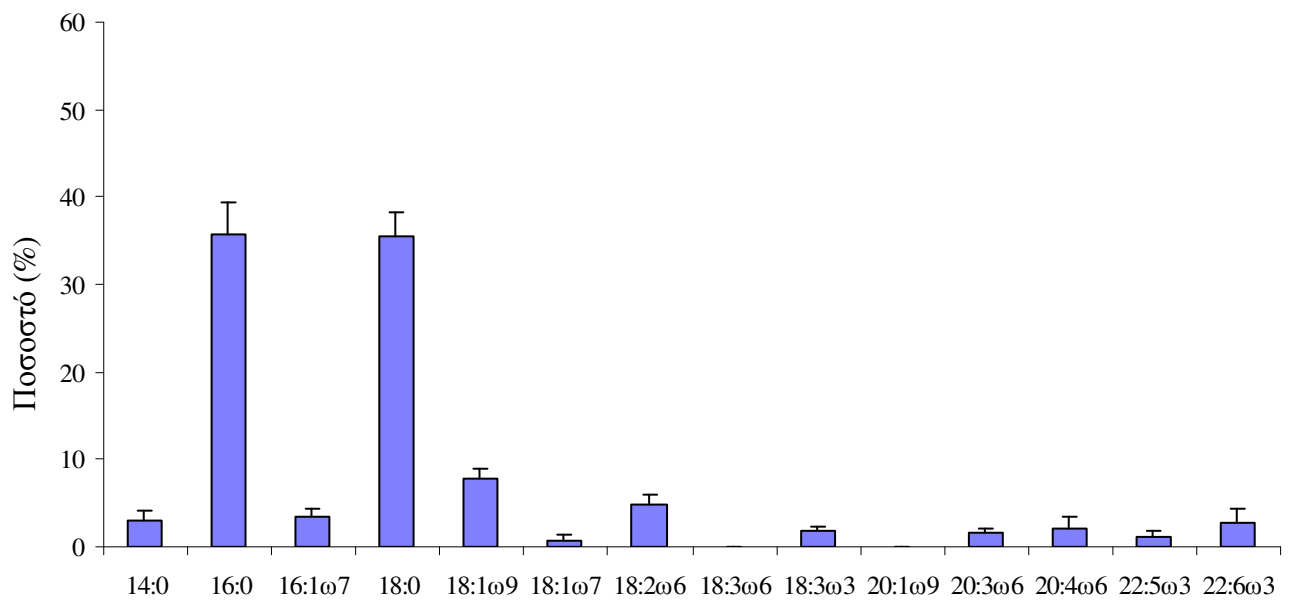
Σχήμα 3. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης



Σχήμα 4. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης



Σχήμα 5. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοσερίνης



Σχήμα 6. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της σφιγγομυελίνης

Πίνακας 3. Δείκτες του προφίλ των λιπαρών οξέων στα τέσσερα φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μυός επιμύων (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση).

Δείκτης	PC	LPC	PS	SM
Κορεσμένα (%)	51,92 ± 2,84 ^{β,γ,δ}	72,26 ± 4,54 ^α	67,03 ± 12,22 ^α	74,05 ± 3,70 ^α
Ακόρεστα (%)	48,08 ± 2,84 ^{β,γ,δ}	27,74 ± 4,54 ^α	32,97 ± 12,22 ^α	25,95 ± 3,70 ^α
Μονοακόρεστα (%)	11,73 ± 1,05	12,85 ± 2,70	17,57 ± 8,78	11,97 ± 1,72
Πολυακόρεστα (%)	36,36 ± 3,35 ^{β,γ,δ}	14,89 ± 4,11 ^α	15,40 ± 4,94 ^α	13,98 ± 2,57 ^α
ω6 (%)	28,92 ± 1,88 ^{β,γ,δ}	9,62 ± 4,30 ^α	6,44 ± 1,86 ^{α,δ}	8,29 ± 2,07 ^{α,γ}
ω3 (%)	7,44 ± 1,56	5,27 ± 1,66	8,96 ± 3,64	5,69 ± 2,12
ω6/ω3	0,71 ± 0,13 ^{β,δ}	1,38 ± 0,48 ^{α,γ}	0,70 ± 0,31 ^{β,δ}	1,51 ± 0,48 ^{α,γ}
A/K*	0,93 ± 0,11 ^{β,γ,δ}	0,37 ± 0,08 ^α	0,57 ± 0,34 ^α	0,35 ± 0,07 ^α
ΔΑ*	141,52 ± 15,68 ^{β,γ,δ}	66,29 ± 13,74 ^α	82,50 ± 30,38 ^α	61,70 ± 12,28 ^α

*A/K: ακόρεστα/κορεσμένα, ΔΑ: δείκτης ακορεστότητας

^α Σημαντικά διαφορετικό από PC (P < 0,05)

^β Σημαντικά διαφορετικό από LPC (P < 0,05).

^γ Σημαντικά διαφορετικό από PS (P < 0,05).

^δ Σημαντικά διαφορετικό από M (P < 0,05).

Στα ω6 λιπαρά οξέα η φωσφατιδυλοχολίνη υπερείχε σημαντικά των τριών άλλων φωσφολιπιδίων. Η φωσφατιδυλοσερίνη περιείχε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό ω:6 λιπαρών οξέων από τη σφιγγομυελίνη.

Ο λόγος ω6/ω3 εμφανίστηκε σημαντικά υψηλότερος στη σφιγγομυελίνη και τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη σε σύγκριση με τη φωσφατιδυλοχολίνη και τη φωσφατιδυλοσερίνη.

Ο λόγος A/K καθώς και ο ΔA εμφανίστηκαν σημαντικά υψηλότεροι στη φωσφατιδυλοχολίνη συγκριτικά με τα άλλα τρία φωσφολιπίδια.

Φωσφολιπίδια

Η εκατοστιαία κατανομή των τεσσάρων φωσφολιπιδίων που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη έρευνα παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Τα τέσσερα αυτά φωσφολιπίδια αποτελούν το 62% των ολικών φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μύος επιμύων.

Πίνακας 4. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή φωσφατιδυλογολίνης (PC), λυσοφωσφατιδυλογολίνης (LPC), φωσφατιδυλοσερίνης (PS) και σφιγγομυελίνης (SM) των μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μύος επιμύων (μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση).

Φωσφολιπίδιο	Ποσοστό (%)
PC	48,40 \pm 5,12
LPC	4,60 \pm 1,12
PS	5,18 \pm 1,55
SM	3,78 \pm 1,05

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα εξέτασε το προφίλ λιπαρών οξέων τεσσάρων φωσφολιπιδίων στα μιτοχόνδρια σκελετικού μυός, προφίλ για το οποίο δεν υπάρχουν στοιχεία στη βιβλιογραφία. Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα περισσότερα λιπαρά οξέα μεταξύ των επιμέρους φωσφολιπιδίων, γεγονός που προκαλεί μεγάλο ενδιαφέρον.

Η φωσφατιδυλοχολίνη ήταν το αφθονότερο φωσφολιπίδιο στο σύνολο των επτά φωσφολιπιδίων που μελετήθηκαν (συνδυασμός με τα δεδομένα από τη μεταπτυχιακή διατριβή της Σοφίας Τσαλουχίδου). Το ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης βρέθηκε 48% τιμή που είναι μεγαλύτερη από αυτή της βιβλιογραφίας 33% (Dohm et al. 1975). Για τα υπόλοιπα τρία φωσφολιπίδια (λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη και σφιγγομυελίνη) δεν βρήκαμε δεδομένα που να αναφέρονται σε μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μυός στη βιβλιογραφία.

Ενδιαφέρον έχει η σύγκριση της ποσοστιαίας κατανομής των παραπάνω φωσφολιπιδίων στα μιτοχόνδρια με την ποσοστιαία κατανομή τους σε ολικό ιστό. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας θα ήταν πιο αξιόπιστη εάν γινόταν σε σχέση με τα αποτελέσματα από ολικό ιστό που προέρχεται από τα ίδια ζώα. Στην παρούσα έρευνα δεν πραγματοποιήσαμε αναλύσεις σε ολικό ιστό, η ανάλυσή τους όμως θα αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε μελλοντική έρευνα του εργαστηρίου μας.

Παρόλα αυτά, από τις έρευνες που βρήκαμε στη βιβλιογραφία, οι οποίες αναφέρονται σε ολικό γαστροκνήμιο μυ, προκύπτει ότι το ποσοστό της φωσφατιδυλοχολίνης κυμαίνεται μεταξύ 44 και 54% (Masoro et al. 1966· Masoro 1967· Górski et al. 1999· Piotrowska et al. 2000). Για τη φωσφατιδυλοσερίνη οι τιμές είναι μεταξύ 3 και 6% και για τη σφιγγομυελίνη μεταξύ 2 και 5,5% (Masoro et al.

1966· Masoro 1967· Gorski et al. 1999· Piotrowska et al. 2000). Οι τιμές που βρήκαμε στη δική μας έρευνα για τα τρία αυτά φωσφολιπίδια στα μιτοχόνδρια ήταν μέσα στα παραπάνω όρια.

Τέλος, όπως επισημάναμε στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, δύο έρευνες (Patriarca et al 1969 και Dobrzyn & Górski 2002) μελέτησαν το προφίλ της φωσφατιδυλοχολίνης και της σφιγγομυελίνης, αντίστοιχα, σε ολικό γαστροκνήμιο μυ. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των ερευνητών αυτών με τα δικά μας, προκύπτει ότι τόσο στον ολικό ιστό όσο και στα μιτοχόνδρια, τα αφθονότερα λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλοχολίνης και της σφιγγομυελίνης είναι τα ίδια αλλά διαφέρουν ως προς τα ποσοστά τους. Συγκεκριμένα στα μιτοχόνδρια η φωσφατιδυλοχολίνη είχε το 16:0 με ποσοστό 42,5%, το 20:4ω6 με ποσοστό 14% και το 18:2ω6 με ποσοστό 14%. Στον ολικό ιστό (Patriarca et al 1969), τα παραπάνω λιπαρά οξέα αποτελούσαν το 39%, 10, και 19%, του συνόλου των λιπαρών οξέων. Η σφιγγομυελίνη στα μιτοχόνδρια είχε το 16:0 με ποσοστό 36% και το 18:0 με ποσοστό 35,5%. Στον ολικό ιστό (Dobrzyn & Górski 2002), τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 24 και 46% στον ερυθρό γαστροκνήμιο, ενώ ήταν 23 και 52% στο λευκό γαστροκνήμιο. Οι διαφορές μεταξύ των ποσοστών των λιπαρών οξέων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ίσως είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός των υποκυτταρικών κλασμάτων και η επιμέρους ανάλυσή τους για την αποφυγή λανθασμένων συμπερασμάτων.

Για τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη δεν βρήκαμε δεδομένα που να αναφέρονται τόσο σε μιτοχόνδρια όσο και σε ολικό ιστό, οπότε δεν μπορούμε να κάνουμε κάποια σύγκριση.

Το πιο εντυπωσιακό εύρημά μας είναι το ξεχωριστό προφίλ λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλοχολίνης σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία φωσφολιπίδια. Το προφίλ αυτό μπορεί επιγραμματικά να συνοψιστεί ως εξής:

- Η φωσφατιδυλοχολίνη είχε μεγάλο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (κατά σειρά 20:4ω6, 18:2ω6 και 22:6ω3).

- Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και η σφιγγομυελίνη είχαν παρόμοιο προφίλ. Περιείχαν κυρίως κορεσμένα λιπαρά οξέα με κύριους εκπροσώπους το 16:0 και 18:0. Μάλλον δεν είναι σύμπτωση ότι αυτή η εντυπωσιακή ομοιότητα στο προφίλ των λιπαρών οξέων εμφανίζεται ανάμεσα σε δύο φωσφολιπίδια με πολύ όμοια δομή (διαφέρουν μόνο ως προς τον κορμό γλυκερόλης ή σφιγγοσίνης).

- Η φωσφατιδυλοσερίνη είχε επίσης μεγάλο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων περιέχοντας κυρίως 16:0 και 18:0, σε μικρότερο όμως ποσοστό από τα δύο προηγούμενα φωσφολιπίδια. Επίσης η φωσφατιδυλοσερίνη εμφάνισε την τάση να έχει μεγάλο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 18:1ω9).

Το παραπάνω προφίλ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη σύσταση της διατροφής (όπου κυριαρχούσαν τα 18:2ω6 με 36%, 18:1ω9 με 32% και 16:0 με 18%), αφού τα τρία αυτά λιπαρά οξέα κυμαίνονται από 3-14%, 7-13% και 21-43% αντίστοιχα, στα φωσφολιπίδια που μελετήθηκαν. Έτσι φαίνεται ότι κυρίαρχο ρόλο στο προφίλ λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων παίζει η εκλεκτικότητα των ενζύμων που τα συνθέτουν ή/και τα αποικοδομούν. Είναι εντυπωσιακό ότι τα ένζυμα αυτά δεν περιορίζουν την εκλεκτικότητά τους στην πολική κεφαλή του φωσφολιπιδίου, (η οποία θα περίμενε κανείς να είναι το στοιχείο διαφοροποίησης των φωσφολιπιδίων), αλλά την επεκτείνουν και στην υδρόφοβη ουρά. Το γεγονός αυτό ενισχύει το ρόλο των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, τόσο στη δομή των κυτταρικών μεμβρανών,

όσο και στη λειτουργικότητα των μεμβρανικών πρωτεϊνών, όσο και στην κυτταρική σηματοδότηση. Πρόκειται προφανώς για ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο μελλοντικής έρευνας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Barclay JK & Stainsby WN (1972). Intramuscular lipid store utilization by contracting dog skeletal muscle in situ. *Am J Physiol* **223**, 115-119.

Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L (2001). *Biochemistry*. Freeman, New York.

Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV (1993). The relation between insulin sensitivity and the fatty acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med* **28**, 238-244.

Bruce Åke (1974a). Skeletal muscle lipids. II. Changes in phospholipid composition in man from fetal to middle age. *J Lipid Res* **15**, 103-107.

Bruce Åke (1974b). Skeletal muscle lipids. III. Changes in fatty acid composition of individual phosphoglycerides in man from fetal to middle age. *J Lipid Res* **15**, 109-113.

Clore JN, Li J, Gill R, Gupta S, Spencer R, Azzam A, Zuelzer W, Rizzo WB, Blackard WG (1998). Skeletal muscle phosphatidylcholine fatty acids and insulin sensitivity in normal humans. *Am J Physiol* **275**, E665-670.

Choy PC, Tran K, Hatch GM, Kroeger EA (1997). Phospholipid metabolism in the mammalian heart. *Prog Lipid Res* **36**, 85-101.

Daum G & Vance JE (1997). Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* **32**, 103-130.

Dobrzyn A, Gorski J (2002). Ceramides and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: content and composition. Effect of prolonged exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E277-285.

Dohm GL, Barakat H, Stephenson TP, Pennington SN, Tapscott EB (1975). Changes in muscle mitochondrial lipid composition resulting from training and exhaustive exercise. *Life Sci* **17**, 1075-1080.

Durstine JL, Grandjean PW, Davis PG, Ferguson MA, Alderson NL, DuBose KD (2001). Blood lipid and lipoprotein adaptations to exercise: a quantitative analysis. *Sports Med* **31**, 1033-1062.

Farooqui AA, Horrocks A, Farooqui T (2000). Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* **106**, 1-29.

Fröberg SO & Mossfeldt F (1971). Effect of prolonged strenuous exercise on the concentration of triglycerides, phospholipids and glycogen in muscle of man. *Acta Physiol Scand* **82**, 167-171.

Fröberg SO (1971). Effect of acute exercise on tissue lipids in rats. *Metabolism* **20**, 714-720.

Górski J (1992). Muscle triglyceride metabolism during exercise. *Can J Physiol Pharmacol* **70**, 123-131.

Górski J, Nawrocki A, Murthy M (1998). Characterization of free and glyceride-esterified long chain fatty acids in different skeletal muscle types of the rat. *Mol Cell Biochem* **178**, 113-118.

Górski J, Oscai LB, Palmer WK (1990). Hepatic lipid metabolism in exercise and training. *Med Sci Sports Exerc* **22**, 213-221.

Górski J, Zendzian-Piotrowska M, de Jong YF, Niklińska W, Glatz JF (1999). Effect of endurance training on the phospholipid content of skeletal muscles in the rat. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **79**, 421-425.

Helge JW & Storlien LH (1999). Muscle membranes, diet and exercise. In *Biochemistry of Exercise X*, ed. Hargreaves M & Thompson M, pp. 57-67. Human Kinetics, Campaign.

Hoppeler H & Flück M (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* **35**, 95-104.

Hulbert AJ, Else PL (1999). Membranes as possible pacemakers of metabolism. *J Theor Biol* **7**, 257-274.

Infante JP, Kirwan RC & Brenna JT (2001). High levels of docosahexaenoic acid (22:6n-3)-containing phospholipids in high-frequency contraction muscles of hummingbirds and rattlesnakes. *Comp Biochem Physiol* **130**, 291-298.

Kogteva GS, Bezuglov VV (1998). Unsaturated fatty acids as endogenous bioregulators. *Biochemistry (Mosc)* **63**, 4-12.

Masoro EJ (1967). Skeletal muscle lipids. III. Analysis of the functioning of skeletal muscle lipids during fasting. *J Biol Chem* **242**, 1111-1114.

Masoro EJ, Rowell LB, McDonald RM, Steiert B (1966). Skeletal muscle lipids. II. Nonutilization of intracellular lipid esters as an energy source for contractile activity. *J Biol Chem* **241**, 2626-2634.

Patriarca P, Zatti M, Gompertz D (1969). Fatty acid composition of the phosphatidylcholine fractions of denervated and tendonectomized rat skeletal muscle. *Biochem J* **115**, 1079-1080.

Piotrowska MZ, Gorska M, Dworakowski W, Górski J (2000). Effect of triiodothyronine on phospholipid metabolism in skeletal muscle of the rat. *J Physiol Pharmacol* **51**, 103-110.

Phinney SD (1996). Arachidonic acid maldistribution in obesity. *Lipids* **31**, S271-S274.

Schiller J & Arnold K (2002). Application of high resolution ³¹P NMR spectroscopy to the characterization of phospholipids composition of tissues and body fluids-a methodological review. *Med Sci Monit* **8**, MT205-MT222.

Van der Vusse GJ, Glatz JF, Stan HCG, Reneman RS (1992). Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* **72**, 881-940.

Voelker DR (2003). New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res* **44**, 441-449.

Wojcik B, Nawrocki A, Chocia G & Gorski J (1999). Effect of exercise on fatty acid content in the rat heart. *Biol Sport* **16**, 87-96.