

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
Κατεύθυνση: ΠΡΟΠΟΝΗΤΙΚΗ ΑΘΛΗΜΑΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΛΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗΣ,
ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΙΝΟΣΙΤΟΛΗΣ, ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΟΛΙΠΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΛΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΤΗΣ
ΚΑΡΔΙΑΣ ΕΠΙΜΥΩΝ**

του Καραογλανίδη Δημητρίου

Θεσσαλονίκη, 2004

Τριμελής επιτροπή:

Βασίλης Μούγιος, αναπληρωτής καθηγητής (επιβλέπων)

Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Α.Π.Θ.

Παντελής Αρζόγλου, αναπληρωτής καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Α.Π.Θ.

Σπύρος Ζλατάνος, επίκουρος καθηγητής

Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Α.Π.Θ.

© 2004
Δημήτρης Ι. Καραογλανίδης
ALL RIGHTS RESERVED

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι πολλά τα συναισθήματα που με διακατέχουν βλέποντας τη δουλειά αυτή να ολοκληρώνεται. Όσα κι αν ήταν τα προβλήματα, ξεπεράστηκαν αφήνοντας πίσω τους μόνο γνώση. Η γνώση αυτή αλλά και η συνολική εργαστηριακή εμπειρία που απέκτησα συνέβαλαν στη διαμόρφωση της κριτικής μου σκέψη κι ασκούν επιρροή σ' όλες τις εκφάνσεις της ζωής μου.

Όλη αυτή η προσπάθεια ευοδώθηκε χάρη στην υπομονή, την οξυδέρκεια και την οργανωτικότητα του επιβλέποντα καθηγητή μου Βασίλη Μούγιου. Από τα βάθη της καρδιάς μου θέλω να τον ευχαριστήσω κατ' αρχήν για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και με δέχθηκε στην ερευνητική του ομάδα αλλά και για όλα όσα μου πρόσφερε και μου δίδαξε.

Πολύτιμη στάθηκε για μένα και η βοήθεια του Μιχάλη Νικολαΐδη που με υπομονή αντιμετώπιζε τις απορίες μου και συνέβαλε κι αυτός με τη σειρά του στην επιστημονική μου κατάρτιση αλλά και της Ανατολής Πετρίδου με τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις της στο κείμενο της διατριβής μου. Παράλειψή μου θα ήταν να μην ευχαριστήσω και τα μέλη της υπόλοιπης ερευνητικής ομάδας, την Τσαλουχίδου Σοφία, την Αργυρού Χρύσα και τον Θεοφιλίδη Γιώργο που υπήρξαν κάτι περισσότερο από απλοί συνεργάτες.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τον αναπληρωτή καθηγητή Παντελή Αρζόγλου και τον επίκουρο καθηγητή Σπύρο Ζλατάνο, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής και που με βοήθησαν με τις χρήσιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου που με στήριξαν και με στηρίζουν σ' όλες μου τις αποφάσεις και σ' όλες τις δύσκολες στιγμές.

Δ.Κ., Θεσσαλονίκη, 7/9/2004

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δημήτρης Ι. Καραογλανίδης

Η σύσταση σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης, της καρδιολιπίνης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης των μιτοχονδρίων της καρδιάς 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 της καρδιάς είτε σε ζώα είτε στον άνθρωπο. Συνεπώς, σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο χαρακτηρισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης, της καρδιολιπίνης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης των μιτοχονδρίων της καρδιάς επιμύων. Το δείγμα ήταν δέκα αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar από τους οποίους αφαιρέθηκε η καρδιά μετά από θανάτωση. 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 κάθε φωσφολιπιδίου. Συνοπτικά, η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη είχε μεγάλο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 22:6ω3), η φωσφατιδυλινο-

σιτόλη είχε μεγάλο ποσοστό 18:0 και 20:4ω6, η καρδιολιπίνη 18:2ω6 και 18:1ω9, και η λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη είχε μεγάλο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων. Οι τόσο έντονες διαφορές στο προφίλ λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων ενισχύουν τη σημασία των επιμέρους λιπαρών οξέων στις κυτταρικές λειτουργίες.

ABSTRACT

Dimitris I. Karaoglanidis

Fatty acid composition of phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, cardiolipin and lysophosphatidylethanolamine of rat heart mitochondria

(Under the supervision of associate professor Vassilis Mougios)

In recent years, a wealth of studies has 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 heart mitochondria. Therefore, the purpose of this study was to characterize the fatty acid composition of phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, cardiolipin and lysophosphatidylethanolamine of rat heart mitochondria. Hearts were removed from ten male Wistar rats. 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 each phospholipid. Briefly, phosphatidylethanolamine had a high percentage of polyunsaturated fatty acids (mainly 22:6 ω 3), phosphatidylinositol had a high percentage of 18:0 and 20:4 ω 6, cardiolipin had a high percentage of 18:2 ω 6 and 18:1 ω 9, and lysophosphatidylethanolamine had a high percentage of saturated fatty acids. 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..... | 4 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ..... | 6 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ..... | 6 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ..... | 6 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ..... | 7 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 8 |
| Το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για την επίδραση της άσκησης στη σύσταση των ιστών σε φωσφολιπίδια και στη σύσταση των φωσφολιπιδίων σε λιπαρά..... | 8 |
| | |
| Η ενασχόληση του εργαστηρίου μας..... | 9 |
| Σημασία του διαχωρισμού υποκυτταρικών κλασμάτων..... | 10 |
| Σημασία του διαχωρισμού των επιμέρους φωσφολιπιδίων..... | 11 |
| Δομή των λιπαρών οξέων..... | 12 |
| Οικογένειες λιπαρών οξέων..... | 13 |
| Ρόλος λιπαρών οξέων..... | 14 |
| Δομή των φωσφολιπιδίων..... | 15 |
| Βιοσύνθεση των γλυκεροφωσφολιπιδίων..... | 17 |
| Φυσιολογικός ρόλος φωσφολιπιδίων..... | 17 |
| Φυσιολογικός ρόλος των φωσφολιπιδίων που εξετάστηκαν..... | 18 |
| Επηρεασμός της λειτουργίας των μεμβρανών από τη σύσταση τους σε λιπαρά οξέα... | 20 |
| Χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων και η πλαστικότητα τους στην άσκηση αντοχής .. | 21 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ..... | 23 |

| | |
|---|----|
| ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ..... | 25 |
| ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ..... | 25 |
| ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ..... | 26 |
| Πειραματόζωα..... | 26 |
| Δειγματοληψία κι επεξεργασία καρδιάς | 26 |
| Ομογενοποίηση καρδιάς | 27 |
| Απομάκρυνση μυοϊνιδίων και πυρήνων..... | 27 |
| Καταβύθιση μιτοχονδρίων..... | 28 |
| Εμπλουτισμός μιτοχονδριακού παρασκευάσματος | 28 |
| Εκχύλιση των λιπιδίων των μιτοχονδρίων..... | 29 |
| Δισδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας..... | 29 |
| Παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων..... | 30 |
| Αέρια χρωματογραφία..... | 31 |
| Στατιστική ανάλυση..... | 33 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 34 |
| Διατροφή..... | 34 |
| Αξιολόγηση τεχνικής απομόνωσης μιτοχονδρίων..... | 34 |
| Λιπαρά οξέα φωσφολιπιδίων..... | 38 |
| Εκατοστιαία κατανομή φωσφολιπιδίων | 44 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 46 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 49 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1. Ποσοστιαία γραμμομοριακή σύσταση των λιπαρών οξέων της τροφής των επιμύων | 37 |
| Πίνακας 2. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των επιμέρους λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης σε καρδιά επίμυος..... | 39 |
| Πίνακας 3. Αποτελέσματα ζευγαρωτών συγκρίσεων του ποσοστού κάθε λιπαρού οξέος σε κάθε δυνατό ζεύγος φωσφολιπιδίων..... | 42 |
| Πίνακας 4. Ποσοστιαία γραμμομοριακή σύσταση λιπαρών οξέων ανάλογα με την ακορεστότητά τους (τιμές \pm SD)..... | 43 |
| Πίνακας 5. Αποτελέσματα ζευγαρωτών συγκρίσεων για κάθε ομάδα λιπαρών οξέων (ανάλογα με την ακορεστότητά τους) σε κάθε δυνατό ζεύγος φωσφολιπιδίων | 44 |
| Πίνακας 6. Ποσοστιαία γραμμομοριακή κατανομή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης στα μιτοχόνδρια της καρδιάς επίμυος..... | 46 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

| | |
|--|----|
| Γράφημα 1. Δομή και συντακτικοί τύποι του μυριστικού, παλμιτικού και στεατικού οξέος | 13 |
| Γράφημα 2α. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδυλαιθανολαμίνης | 16 |
| Γράφημα 2β. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδυλινοσιτόλης | 16 |
| Γράφημα 2γ. Σχηματική αναπαράσταση καρδιολιπίνης | 16 |
| Γράφημα 2δ. Σχηματική αναπαράσταση λυσο φωσφατιδυλαιθανολαμίνης | 16 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

| | |
|---|----|
| Σχήμα 1. Τυπικός διαχωρισμός φωσφολιπιδίων από μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μυός επιμύων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας | 35 |
| Σχήμα 2. Τυπικό χρωματογράφημα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων προερχόμενων από φωσφολιπίδιο (φωσφατιδυλαιθανολαμίνη) μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μυός επιμύων..... | 36 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

| | |
|-----|----------------------------|
| CCO | Οξιδάση του κυτοχρώματος c |
| CL | Καρδιολιπίνη |
| LPC | Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη |
| LPE | Λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη |
| PC | Φωσφατιδυλοχολίνη |
| PE | Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη |
| PI | Φωσφατιδυλινοσιτόλη |
| PS | Φωσφατιδυλοσερίνη |
| SM | Σφιγγομυελίνη |
| ΔΑ | Δείκτης ακορεστότητας |

Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗΣ, ΤΗΣ
ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΙΝΟΣΙΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΟΛΙΠΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΑΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΤΗΣ
ΚΑΡΔΙΑΣ 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 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 (βλ. Durstine et al. 2001, Górski et al. 1990, Górski 1992 και van der Vusse & Reneman 1996 για ανασκοπήσεις). 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 την απαρτίζουν διαδραματίζουν ξεχωριστούς ρόλους σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Έτσι, αρκετοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να αποκαλύψουν τις επιδράσεις της άσκησης στο προφίλ λιπαρών οξέων διαφόρων 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 του περιβάλλοντος) 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 ήταν 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 ειδών τους. Όμως, ο διαχωρισμός των υποκυτταρικών κλασμάτων και των επιμέρους 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 διαφόρων ιστών, δεν έχει γίνει διαχωρισμός υποκυτταρικών κλασμάτων. Ωστόσο, 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 φωσφολιπιδίων

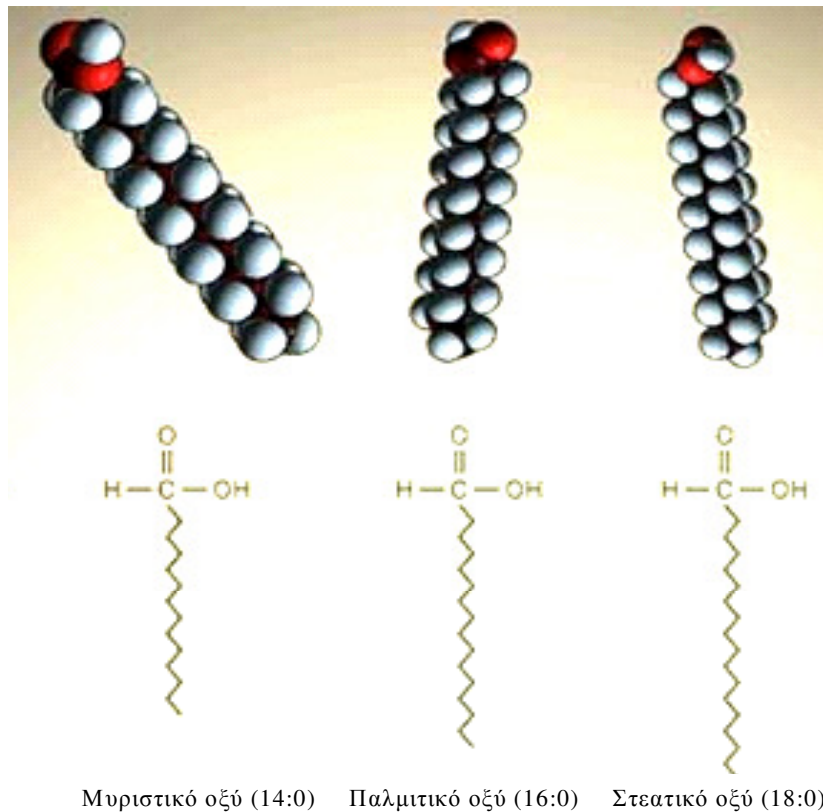
Η ανάλυση των συνολικών φωσφολιπιδίων ενός ιστού οδηγεί σε προβλήματα παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Επειδή το προφίλ των λιπαρών οξέων των διαφόρων φωσφολιπιδίων είναι διαφορετικό, μία και μόνο αλλαγή που θα συνέβαινε στην ποσότητα κάποιου φωσφολιπιδίου ίσως οδηγούσε σε κάλυψη μιας διαφοροποίησης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

Συμπερασματικά, ο διαχωρισμός υποκυτταρικών κλασμάτων και 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 είναι οργανικά οξέα με σχετικά μεγάλο αριθμό ατόμων άνθρακα. Αποτελούνται από μια αλειφατική αλυσίδα και μια καρβοξυλομάδα στην άκρη. Αναφέρονται συνήθως με τις εμπειρικές τους ονομασίες, όμως περισσότερο κατατοπιστικός 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 συμβολίζεται ως 16:0 αφού είναι κορεσμένο (δεν περιέχει διπλούς δεσμούς). Στο γράφημα 1 παρουσιάζεται η δομή και ο συντακτικός τύπος τριών κορεσμένων λιπαρών οξέων. Το παλμιτελαϊκό οξύ συμβολίζεται ως 16:1ω7, αφού είναι ακόρεστο κι έχει ένα διπλό δεσμό στην έβδομη θέση από το μεθυλικό άνθρακα.

Από τα πολλά λιπαρά οξέα που απαντώνται στους ζωικούς ιστούς, έξι, το 16:0, το στεατικό (18:0), το ελαϊκό (18:1ω9), το λινελαϊκό (18:2ω6), το αραχιδονικό (20:4ω6) και το εικοσιδιεξαενοϊκό (22:6ω3) αποτελούν περίπου το 90% του συνόλου.



Γράφημα 1. Δομή και συντακτικοί τύποι του μυριστικού, παλμιτικού και στεατικού οξέος.

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 την 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 $\omega 3$ και $\omega 6$ λιπαρά οξέα. Τα ζώα δεν μπορούν να συνθέσουν $\omega 3$ και $\omega 6$ 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, δηλαδή μη εστεροποιημένη μορφή. Τα περισσότερα είναι στην πραγματικότητα ακυλομάδες 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 των μιτοχονδρίων του σκελετικού μυός έχουν υψηλό ποσοστό 22:6 ω 3 και χρησιμεύουν ως δομικοί συμπαράγοντες για τη λειτουργία διαφόρων μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως αντλιών ιόντων και συμπλεγμάτων μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (Infante et al. 2001). Μύες με υψηλά ποσά μιτοχονδριακών αναπνευστικών ενζύμων είχαν υψηλές συγκεντρώσεις 22:6 ω 3 στα φωσφολιπίδια 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.

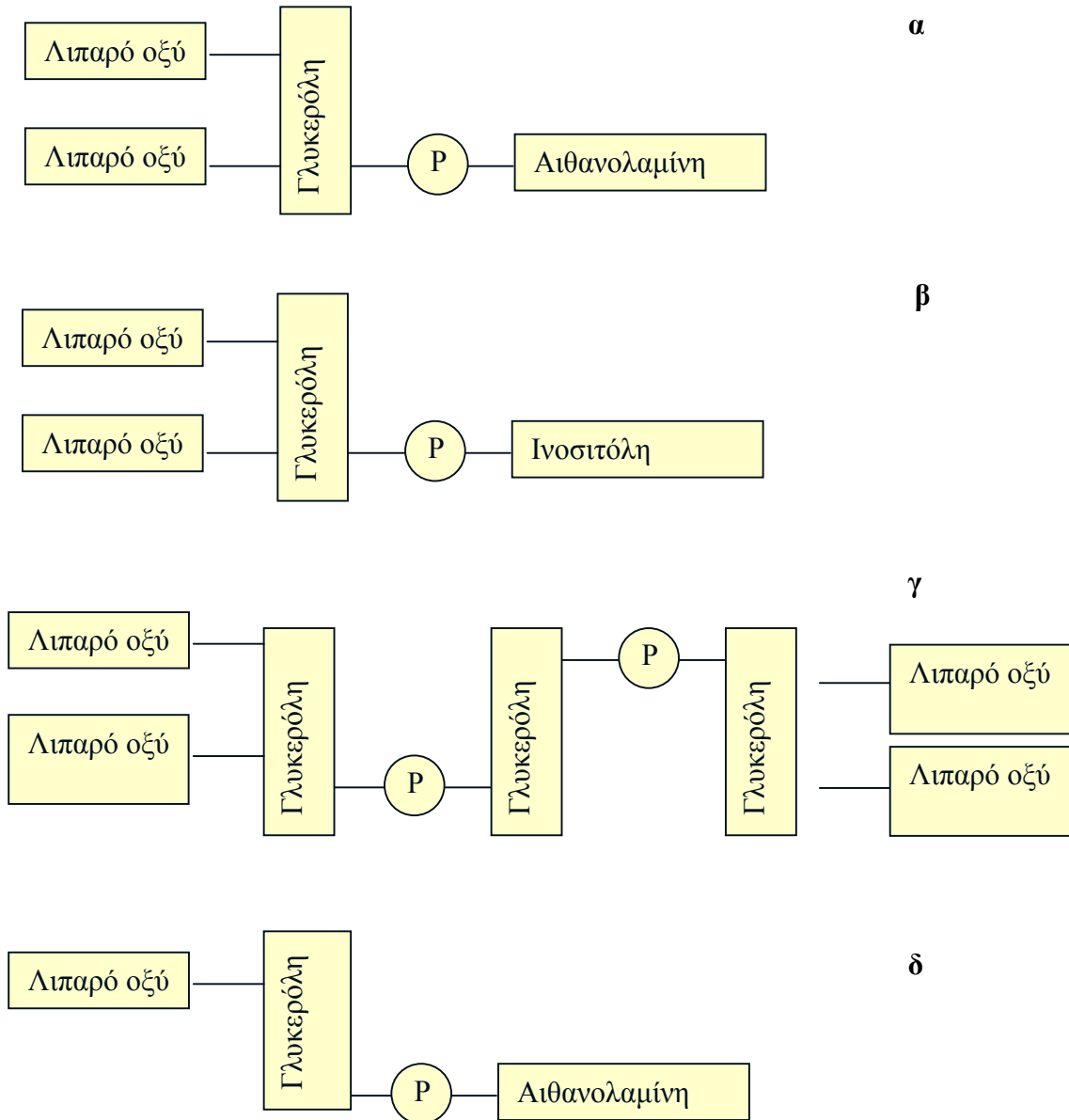
Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι αλλαγές στη σύσταση λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, όπως μεταβολές του ποσοστού του 20:4ω6, μπορεί να είναι καθοριστικής σημασίας για πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως χρόνιες καρδιαγγειακές ασθένειες και φλεγμονές (Schiller & Arnold 2002).

Τέλος, σε περιβάλλον αθλητικής φυσιολογίας, η αυξημένη πρόσληψη ω3 λιπαρών οξέων έχει αναφερθεί ότι μειώνει την αντοχή επιμύων (Ayre & Hulbert 1997) και σολομών (McKenzie et al. 1998).

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. Τέλος, η σφιγγομυελίνη, ένα άλλο φωσφολιπίδιο

αποτελείται από έναν κορμό σφινγοςίνης, στον οποίο είναι συνδεδεμένες μία ακυλομάδα και μία φωσφορική χολίνη. Σχηματική αναπαράσταση των φωσφολιπιδίων που εξετάσαμε παρουσιάζεται στο γράφημα 2.



Γράφημα 2. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (α), φωσφατιδυλινοσιτόλης (β), καρδιολιπίνης (γ) και λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης (δ)

Βιοσύνθεση των γλυκεροφωσφολιπιδίων

Για τη σύνθεση των γλυκεροφωσφολιπιδίων απαιτείται σύνδεση φωσφατιδικού οξέος και μιας αλκοόλης. Όπως σε όλες τις αναβολικές διεργασίες, μία τουλάχιστον 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 κυτιδυλοδιφωσφορική διακυλογλυκερόλη. Αυτή η αντίδραση προχωράει με τη βοήθεια της υδρόλυσης του πυροφωσφορικού οξέος.

Στη συνέχεια το ενεργοποιημένο μόριο της κυτιδυλοδιφωσφορικής διακυλογλυκερόλης αντιδρά με την υδροξυλομάδα μιας αλκοόλης και σχηματίζεται η συνδετική διάταξη ενός φωσφοδιεστέρα. Εάν για παράδειγμα η αλκοόλη είναι η αιθανολαμίνη, τότε τα προϊόντα είναι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και η μονοφωσφορική κυτιδίνη.

Ένα τυπικό ζωικό κύτταρο μπορεί να περιέχει χιλιάδες διαφορετικά φωσφολιπίδια (Berg et al. 2001). Συνήθως 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 αγγελιοφόρους (όπως η διακυλογλυκερόλη και η τριφωσφορική ινοσιτόλη) που απελευθερώνονται ως ανταπόκριση σε εξωκυτταρικά σήματα και μεταφέρουν πληροφορίες στο εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης, τα φωσφολιπίδια μπορούν να παρέχουν ενέργεια μέσω των λιπαρών τους οξέων, 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 τη μειώνει ελαφρά στη καρδιά (Fröberg 1971, Wójcik et al 1999).

Φυσιολογικός ρόλος των φωσφολιπιδίων που εξετάστηκαν

Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελεί ένα από τα κυριότερα φωσφολιπίδια των μιτοχονδριακών μεμβρανών, όντας το δεύτερο πιο άφθονο φωσφολιπίδιο μετά τη φωσφατιδυλοχολίνη (Daum 1985). Αναφέρεται ότι οι λειτουργίες όσμωσης και ιοντικής δέσμευσης επηρεάζονται από την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (Daum 1985). Επιπλέον, 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 προσταγλαδινών (Choy et al. 1997).

Η φωσφατιδυλινοσιτόλη αντιπροσωπεύει περίπου το 5% των συνολικών φωσφολιπιδίων στις μιτοχονδριακές μεμβράνες (Daum 1985). Η εμπλοκή της στην πρόσδεση πρωτεϊνών στις μεμβράνες έχει καλά τεκμηριωθεί (Choy et al. 1997). Η δισφωφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη μπορεί να υδρολυθεί από τη φωσφολιπάση C προς τρισφωφορική ινοσιτόλη και διακυλογλυκερόλη, μόρια που αποτελούν δύο ενδιάμεσα προϊόντα-κλειδιά στη μετακίνηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} και στην ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Voelker 1991). Έχει αποδειχθεί ότι η φωσφατιδυλινοσιτόλη είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση αρκετών μεμβρανικών ενζύμων και πιθανά ασκεί ρυθμιστικό ρόλο σε μηχανισμούς υποδοχής (Kalofoutis et al. 1980).

Η καρδιολιπίνη συνδέεται με τα μιτοχόνδρια, και ειδικότερα με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Haines & Dencher 2002). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι το μόνο φωσφολιπίδιο που συντίθεται στα μιτοχόνδρια και παραμένει εκεί κατά τη διάρκεια όλης της ζωής του κυττάρου (Haines & Dencher 2002). Αντιπροσωπεύει το 10-20% των συνολικών μιτοχονδριακών φωσφολιπιδίων, με εξαίρεση τα μιτοχόνδρια του εγκεφάλου των επιμύων, τα οποία περιέχουν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό από αυτό το φωσφολιπίδιο (Daum 1985). Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η καρδιολιπίνη βρίσκεται αποκλειστικά στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, ενώ στην εξωτερική υπάρχει εξαιτίας της επιμόλυνσης της τελευταίας κατά τη διάρκεια της απομόνωσής της (Daum 1985). Πολλές έρευνες τα τελευταία χρόνια συνδέουν την καρδιολιπίνη με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η καρδιολιπίνη πιθανά επηρεάζει τη λειτουργικότητα αρκετών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως η οξειδάση του κυτοχρώματος (Haines & Dencher 2002). Επιπρόσθετα, κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η καρδιολιπίνη εμπλέκεται στη διατήρηση της ρευστότητας των μιτοχονδριακών μεμβρανών ενάντια στις αλλαγές που προκαλεί η θερμοκρασία του περιβάλλοντος (Yamauchi et al. 1981).

Τέλος, η εμπλοκή της καρδιολιπίνης στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ή συνηθέστερα απόπτωση, έχει καλά τεκμηριωθεί. Στην απόπτωση οδηγούν περισσότερα από ένα σύνθετα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία δεν είναι ακόμη γνωστά λεπτομερώς. Σύμφωνα με μια υπόθεση που διατυπώθηκε πρόσφατα (McMillin & Dowhan 2002), η μείωση της καρδιολιπίνης από κάποια αποπτωτικά αίτια (όπως η αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και η παραγωγή ελεύθερων ριζών) οδηγεί στην αποκόλληση κυτοχρώματος c από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτό, σε συνδυασμό με την αύξηση της διαπερατότητας της εξωτερικής

μιτοχονδριακής μεμβράνης (που αποτελεί χαρακτηριστικό της απόπτωσης) οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα. Εκεί αυτό συμβάλλει στην ενεργοποίηση μιας πρωτεΐνης, της κασπάσης 3, που καταστρέφει κυτταρικές πρωτεΐνες.

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 et al. 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, διάλυοι 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 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 δραστικότητας μεμβρανικών πρωτεϊνών που ελέγχουν πολλές πλευρές της κυτταρικής λειτουργίας (Helge & Storlien 1999).

Χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων και η πλαστικότητα τους στην άσκηση αντοχής

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια του κυττάρου με μέγεθος μόλις 0,5-1 μm , υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας μέσα στα κύτταρα με τη μορφή ATP. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν συστατικά μόνο των ευκαρυωτικών κυττάρων. Διαθέτουν μια εξωτερική 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, γ) την εσωτερική μεμβράνη και δ) τη μιτοχονδριακή μήτρα.

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 του DNA, τη σύνθεση πρωτεϊνών, την ενεργό μεταφορά μορίων μέσω μεμβρανών, την κυτταρική διαίρεση, τη λειτουργία του μυϊκού συστήματος κ.ά. Για τη λειτουργία τους αυτή τα μιτοχόνδρια χρειάζονται πρώτες ύλες (κυρίως υδατάνθρακες και λιπίδια) καθώς και οξυγόνο.

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν DNA, συνήθως σε κυκλική μορφή, το οποίο κωδικοποιεί ορισμένες μόνο από τις πρωτεΐνες 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 πρωτεΐνες που έχουν συντεθεί στο κυτταρόπλασμα (Daum & Vance 1997).

Πολλές από τις βιοχημικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων εξαρτώνται έντονα από τα λιπίδια και ειδικότερα από τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών τους. Χαρακτηριστικά των μιτοχονδριακών μεμβρανών είναι η παρουσία καρδιολιπίνης και το μικρό ποσοστό στερολών και σφιγγομυελίνης. Τα επίπεδα της φωσφατιδυλινοσιτόλης είναι χαμηλότερα, ενώ της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης υψηλότερα συγκριτικά με τις μεμβράνες άλλων οργανιδίων ή υποκυτταρικών κλασμάτων (μικροσωμάτια, λυσοσωμάτια, πυρήνας, σύστημα Golgi).

Τα μιτοχόνδρια είναι τα κύρια υποκυτταρικά οργανίδια που καθορίζουν τις απαιτήσεις του μυός σε οξυγόνο (Hoppeler & Flück 2003). 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

Ο Daum (1985) σε ανασκόπησή του αναφέρει έρευνα που ασχολήθηκε με τα φωσφολιπίδια της καρδιάς κουνελιών και βρήκε ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 41%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 1% και η καρδιολιπίνη το 11% των ολικών φωσφολιπιδίων. Ομοίως, έρευνα των Pierce και συν. (1989) μέτρησε τα ποσοστά των επιμέρους φωσφολιπιδίων στην καρδιά επιμύων και ανέφερε ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 29% και η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 9% των ολικών φωσφολιπιδίων. Τέλος, οι Han και συν. (2000) μέτρησαν τα ποσοστά των επιμέρους φωσφολιπιδίων στην καρδιά επιμύων και ανέφεραν ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 38%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 4% και η καρδιολιπίνη το 10% των ολικών φωσφολιπιδίων.

Ο Daum (1985) αναφέρει, επίσης, τέσσερις έρευνες που μέτρησαν τα επιμέρους φωσφολιπίδια σε μιτοχόνδρια της καρδιάς επιμύων. Οι έρευνες αυτές βρήκαν 1-2% φωσφατιδικό οξύ, 22-36% φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, 5-8% φωσφατιδυλινοσιτόλη και 12-17% καρδιολιπίνη. Οι Kalofoutis και συν. (1980) εξέτασαν επιπλέον την επίδραση της χρόνιας άσκησης στη σύσταση των επιμέρους φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων της καρδιάς επιμύων. Παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά των φωσφολιπιδίων, με αύξηση της φωσφατιδυλινοσιτόλης και μείωση της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης.

Οι Roquelin και συν. (1981) μελέτησαν την επίδραση της χρόνιας άσκησης στη σύσταση των φωσφολιπιδίων στην καρδιά επιμύων (σε ολικό ιστό). Τα ποσοστά των φωσφολιπιδίων που αναλύθηκαν ήταν 30% για τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, 1% για τη φωσφατιδυλινοσιτόλη και 11,6% για την καρδιολιπίνη. Η άσκηση, και σε αυτή τη μελέτη, αύξησε το ποσοστό της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης και μείωσε αυτό της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης. Στην ίδια μελέτη μέτρησαν επίσης τα

λιπαρά οξέα των τριών επιμέρους φωσφολιπιδίων πριν και μετά από χρόνια άσκηση. Σε γενικές γραμμές, η χρόνια άσκηση προκάλεσε αρκετές σημαντικές αλλαγές στο προφίλ των λιπαρών οξέων και των τριών φωσφολιπιδίων.

Τέλος, οι Liang και συν. (1992) μέτρησαν την ποσοστιαία κατανομή φωσφολιπιδίων σε ολικό καρδιακό ιστό επιμύων και βρήκαν ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 23% των ολικών φωσφολιπιδίων, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 5% και η κρδιολιπίνη το 16%. Στην έρευνα αυτή έγινε και σύγκριση των πειραματόζωων πριν και μετά από χρόνια άσκηση αναφορικά με την ποσοστιαία κατανομή των επιμέρους καρδιακών φωσφολιπιδίων. Μετά τη χρόνια άσκηση βρέθηκε σημαντική μείωση της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (όπως και στις άλλες δύο σχετικές μελέτες), ενώ η φωσφατιδυλινοσιτόλη (σε αντίθεση με τις άλλες δύο) και η κρδιολιπίνη δε μεταβλήθηκαν σημαντικά.

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 της καρδιάς είτε σε ζώα είτε στον άνθρωπο. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αποτελούν την κύρια ενεργειακή πηγή της καρδιάς. Η καρδιά αποτελεί, επίσης, μια σημαντική ενδογενή αποθήκη λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, τα οποία είναι κορεσμένα και βρίσκονται κυρίως στα φωσφολιπίδια και τις τριακυλογλυκερόλες. Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό λιπαρών οξέων παραμένουν ακόρεστα (Wózciak et al. 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των φωσφολιπιδίων βρίσκεται στα μιτοχόνδρια.

Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στη σημαντικότητα της μελέτης του προφίλ των λιπαρών οξέων στα επιμέρους φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων της καρδιάς. Συνεπώς, σκοπός της έρευνας ήταν ο χαρακτηρισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης, της καρδιολιπίνης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης των μιτοχονδρίων της καρδιάς επιμύων.

ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σε συνδυασμό με μια άλλη μεταπτυχιακή διατριβή που μελετά τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια του καρδιακού μυός, η παρούσα έρευνα παρέχει μια πλήρη εικόνα της σύστασης σε λιπαρά οξέα των μιτοχονδριακών φωσφολιπιδίων. Τα ευρήματα αυτά θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως εφελτήριο για τη μέτρηση των παραπάνω παραμέτρων σε ιστούς πειραματόζων μετά από άσκηση με σκοπό τη διαλεύκανση των επιδράσεών της 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». Στη μελέτη χρησιμοποιήσαμε 10 ενήλικες άρρενες επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 3 μηνών. Τα πειραματόζωα διαβίουν 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.

Δειγματοληψία κι επεξεργασία καρδιάς

- ❖ Θανατώσαμε τα δέκα πειραματόζωα περίπου την ίδια ώρα της ημέρας (09:00 - 11:00) με τραχηλική μετατόπιση, μετά από σύντομη αναισθησία σε ειδική γυάλα με αιθέρα. Επιλέξαμε τη μέθοδο αυτή ώστε να προκαλέσουμε ακαριαίο θάνατο, χωρίς φαινόμενα ασφυξίας στο ζώο.
- ❖ Εξάγαμε την καρδιά κάθε ζώου αμέσως μετά τη θανάτωσή του.
- ❖ Αμέσως μετά την εξαγωγή της καρδιάς τη βυθίσαμε σε υγρό άζωτο και την κονιορτοποιήσαμε με γουδί και γουδοχέρι.
- ❖ 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 καρδιάς

Η ομογενοποίηση έγινε με σκοπό τη δημιουργία ενός ομογενούς διαλύματος για περαιτέρω επεξεργασία του δείγματός μας.

- ❖ Ομογενοποιήσαμε με γυάλινο ομογενοποιητή της εταιρίας Kontes (Vineland, NJ, ΗΠΑ) 150 mg ιστού με την προσθήκη 19 όγκων ισοτονικού διαλύματος 250 mM σακχαρόζης και 10 mM Tris-HCl (pH 7,3). Κατα τη διάρκεια της ομογενοποίησης, ο ομογενοποιητής βρισκόταν βυθισμένος σε πάγο.
- ❖ Αφαιρέσαμε 50 μ L ομογενοποιημένου για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης και της δραστηριότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* (cytochrome *c* oxidase, CCO) στον ολικό ιστό.

Απομάκρυνση μυοϊνιδίων και πυρήνων

Η απομάκρυνση μυοϊνιδίων και πυρήνων βασίστηκε στη μέθοδο της φυγοκέντρωσης που επιτρέπει σύμφωνα με την ταχύτητά της, την καταβύθιση σωματιδίων ανάλογα με το ειδικό βάρος τους.

- ❖ Μεταφέραμε το ομογενοποίημα σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 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.
- ❖ Μεταφέραμε την υπερκείμενη στοιβάδα σε άλλο φυγοκεντρικό σωλήνα και κάναμε ανασύσταση του ιζήματος με 3 mL διαλύματος ομογενοποίησης.
- ❖ Επαναλάβαμε τη διαδικασία της φυγοκέντρωσης - έκπλυσης άλλες δύο φορές.
- ❖ Μεταφέραμε τα υπερκείμενα υγρά σ' ένα φυγοκεντρικό σωλήνα.

Καταβύθιση μιτοχονδρίων

Η καταβύθιση μιτοχονδρίων βασίστηκε στην αρχή της φυγοκέντρωσης όπως παραπάνω.

- ❖ Φυγοκεντρήσαμε το υπερκείμενο υγρό στα $10.000 \times g$ για 10 min στους 4 C. Η ταχύτητα αυτή κρίθηκε ικανή για την καταβύθιση των μιτοχονδρίων μετά από πιλοτικά πειράματα.
- ❖ Απομακρύναμε την υπερκείμενη στοιβάδα και κάναμε ανασύσταση του ιζήματος με 7 mL διαλύματος ομογενοποίησης.
- ❖ Επαναλάβαμε τη διαδικασία φυγοκέντρωσης - έκπλυσης άλλες δύο φορές.
- ❖ Παραλάβαμε το ίζημα και το μεταφέραμε σε φαρδύ γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Η έκπλυση του φυγοκεντρικού σωλήνα έγινε με 200 μL διαλύματος ομογενοποίησης.
- ❖ Μετρήσαμε τον όγκο του μιτοχονδριακού παρασκευάσματος (περίπου 0,5 mL) με αυτόματη πιπέτα. Αφαιρέσαμε 50 μL για τον προσδιορισμό της CCO και της πρωτεΐνης με σκοπό τη μέτρηση του εμπλουτισμού του παρασκευάσματος σε μιτοχόνδρια.

Εμπλουτισμός μιτοχονδριακού παρασκευάσματος

Για τον υπολογισμό του εμπλουτισμού του παρασκευάσμάτος μας σε μιτοχόνδρια υπολογίστηκε η ειδική δραστικότητα της CCO (U/mg πρωτεΐνης) στο ομογενοποίημα της καρδιάς και στο μιτοχονδριακό παρασκεύασμα (διπλωματική Ελένης Ορφανίδου).

- ❖ Υπολογίστηκε ο εμπλουτισμός του μιτοχονδριακού παρασκευάσματος σε CCO (δηλαδή σε μιτοχόνδρια) ως το πηλίκο της ειδικής δραστικότητας της CCO στα μιτοχόνδρια προς την ειδική δραστικότητά της στην καρδιά.

Εκχύλιση των λιπιδίων των μιτοχονδρίων

- ❖ Ξεκινήσαμε την εκχύλιση των λιπιδίων με προσθήκη στο δείγμα 6,8 mL μείγματος χλωροφορμίου–μεθανόλης 2:1 (v/v), ανάδευση και αναμονή για 5 min.
- ❖ Προσθέσαμε 1,4 mL νερό και αναδεύσαμε ζωηρά για 1 min με σκοπό την ολοκλήρωση της εκχύλισης των λιπιδίων (Folch et al. 1957).
- ❖ Μεταφέραμε όλο το υλικό σε δύο γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και φυγοκεντρήσαμε το δείγμα σε φυγοκεντρητή K-40 της εταιρείας Hellenic Labware (Αθήνα) στα 1500 × g για 5 min.
- ❖ Αφαιρέσαμε αρκετή ποσότητα από την πάνω φάση, για να γίνει ευκολότερα η λήψη της κάτω φάσης.
- ❖ Μεταφέραμε την κάτω φάση και των δύο δοκιμαστικών σωλήνων σε φαρδύ δοκιμαστικό σωλήνα και συμπυκνώσαμε το εκχύλισμα με εξάτμιση κάτω από ρεύμα N₂ με ελαφριά θέρμανση (40 °C).

Δισδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Ο διαχωρισμός των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων πραγματοποιήθηκε με δισδιάστατη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin-layer chromatography, TLC). 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.

- ❖ Ο διαλύτης για την πρώτη διάσταση παρασκευάστηκε ως εξής: Αναμείξαμε 100 mL χλωροφορμίου, 50 mL μεθανόλης και 10 mL οξικού οξέος σε κωνική φιάλη

250 mL. Μετά από ζωηρή ανάδευση αδειάσαμε το διάλυμα σε γυάλινο δοχείο για TLC και το αφήσαμε για μία ώρα.

❖ Διαλύσαμε το συμπυκνωμένο εκχύλισμα σε 50 μ L χλωροφόρμιου – μεθανόλης 2:1 (v/v) κι ενσταλλάξαμε όλο το υλικό στη γωνία μιας πλάκας από σίλικα της εταιρείας Sigma (St. Louis, MO, ΗΠΑ).

❖ Η πλάκα αναπτύχθηκε στο πρώτο σύστημα διαλυτών για 90 min.

❖ Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της πλάκας στο πρώτο σύστημα διαλυτών παρασκευάστηκε ο δεύτερος διαλύτης ως εξής: Αναμείξαμε 80 mL χλωροφορμίου, 32 mL ακετόνης, 16 mL μεθανόλης, 16 mL οξικού οξέος και 8 mL νερού, σε κωνική φιάλη 250 mL. Μετά από ζωηρή ανακίνηση αδειάσαμε το διάλυμα σε γυάλινο δοχείο για TLC και το αφήσαμε για μία ώρα.

❖ Μετά το τέλος της ανάπτυξης της πλάκας στο πρώτο σύστημα διαλυτών, την αφήσαμε να στεγνώσει στον απαγωγό για 40 min.

❖ Αναπτύξαμε την πλάκα με περιστροφή 90° στο δεύτερο σύστημα διαλυτών.

❖ Η πλάκα ξηράνθηκε όπως παραπάνω.

❖ Ψεκάσαμε με διάλυμα 0,2 % διχλωροφλουορεσεΐνης σε αιθανόλη για τον εντοπισμό των κηλίδων των φωσφολιπιδίων κάτω από υπεριώδες φως. Για την αξιολόγηση της τεχνικής διαχωρισμού των φωσφολιπιδίων ψεκάσαμε μια πλάκα από σίλικα με νινυδρίνη για τον εντοπισμό της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης (φωσφολιπίδια με πρωτοταγείς αμινομάδες).

Παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων

Η μέτρηση των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων έγινε μέσω της μετατροπής τους σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, οι οποίοι μετρήθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας.

- ❖ Σε τέσσερις γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, προσθέσαμε 5 mL δεκαπενταενοϊκού οξέος συγκέντρωσης 1 μg/mL.
- ❖ Αποξέσαμε τις κηλίδες από την πλάκα TLC που αντιστοιχούσαν στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, τη φωσφατιδυλινοσιτόλη την καρδιολιπίνη και τη λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη στους παραπάνω γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- ❖ Προσθέσαμε 0,5 mL μεθανολικού διαλύματος μεθοξιδίου του νατρίου (Sigma) και επώασαμε στους 50°C για 10 min.
- ❖ Προσθέσαμε 0,5 mL μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βορίου (Fluka, Buchs, Ελβετία) και η επώαση επαναλήφθηκε όπως προηγουμένως (Kramer et al., 1997).
- ❖ Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων που παράχθηκαν εκχυλίστηκαν με 1,5 mL εξάνιο. Έπειτα αναδεύσαμε ζωηρά για 1 min.
- ❖ Από τις δύο σχηματιζόμενες στιβάδες μεταφέραμε την υπερκείμενη (που περιείχε τους μεθυλεστέρες) σε νέο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίσαμε κάτω από ρεύμα N₂ για τη συμπύκνωση των μεθυλεστερών.

Αέρια χρωματογραφία

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 τη 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 της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης, της καρδιολιπίνης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης αντίστοιχα σε 40, 30, 30 και 30 μL εξανίου και εισάγαμε 1, 3, 3 και 3 μL με μικροσύριγγα στην αρχή της στήλης.

❖ Κατά την έξοδο του από τη στήλη, κάθε μεθυλεστέρας ανιχνευόταν με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας και το παραγόμενο ηλεκτρικό σήμα διοχετεύοταν 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 ποσότητας του μεθυλεστέρα και υπολογιζόταν με ολοκλήρωση από το πρόγραμμα HP 3365 ChemStation της Hewlett-Packard.

Η σύσταση της τροφής σε λιπαρά οξέα προσδιορίστηκε με την προσθήκη μεθανολικού διαλύματος μεθοξειδίου του νατρίου και μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βορίου, όπως περιγράφηκε παραπάνω, σε μια ελάχιστη ποσότητα

τροφής. Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίστηκαν και διαχωρίστηκαν με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας.

Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Εξετάσαμε την κατανομή όλων των εξαρτημένων μεταβλητών με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov και βρήκαμε να μη διαφέρει σημαντικά από την κανονική. Για να συγκρίνουμε τα λιπαρά οξέα μεταξύ των τριών φωσφολιπιδίων πραγματοποιήσαμε ανάλυση διακύμανσης, με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Για την πραγματοποίηση ζευγαρωτών συγκρίσεων πραγματοποιήσαμε ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$. Για όλες τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε 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), παλμιτικό (16:0), παλμιτελαϊκό (16:1ω7), στεατικό (18:0), ελαϊκό (18:1ω9), *cis*-βαξενικό (18:1ω7), λινελαϊκό (18:2ω6), *γ*-λινελανικό (18:3ω6), *α*-λινελανικό (18:3ω3), γονδοϊκό (20:1ω9), διομο-*γ*-λινελανικό (20:3ω6), αραχιδονικό (20:4ω6), εικοσιδιπενταενοϊκό (22:5ω3) και εικοσιδιεξαενοϊκό (22:6ω3). Μια τυπική πλάκα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας παρουσιάζεται στο σχήμα 1, ενώ ένα τυπικό χρωματογράφημα των λιπαρών οξέων στο σχήμα 2.

Διατροφή

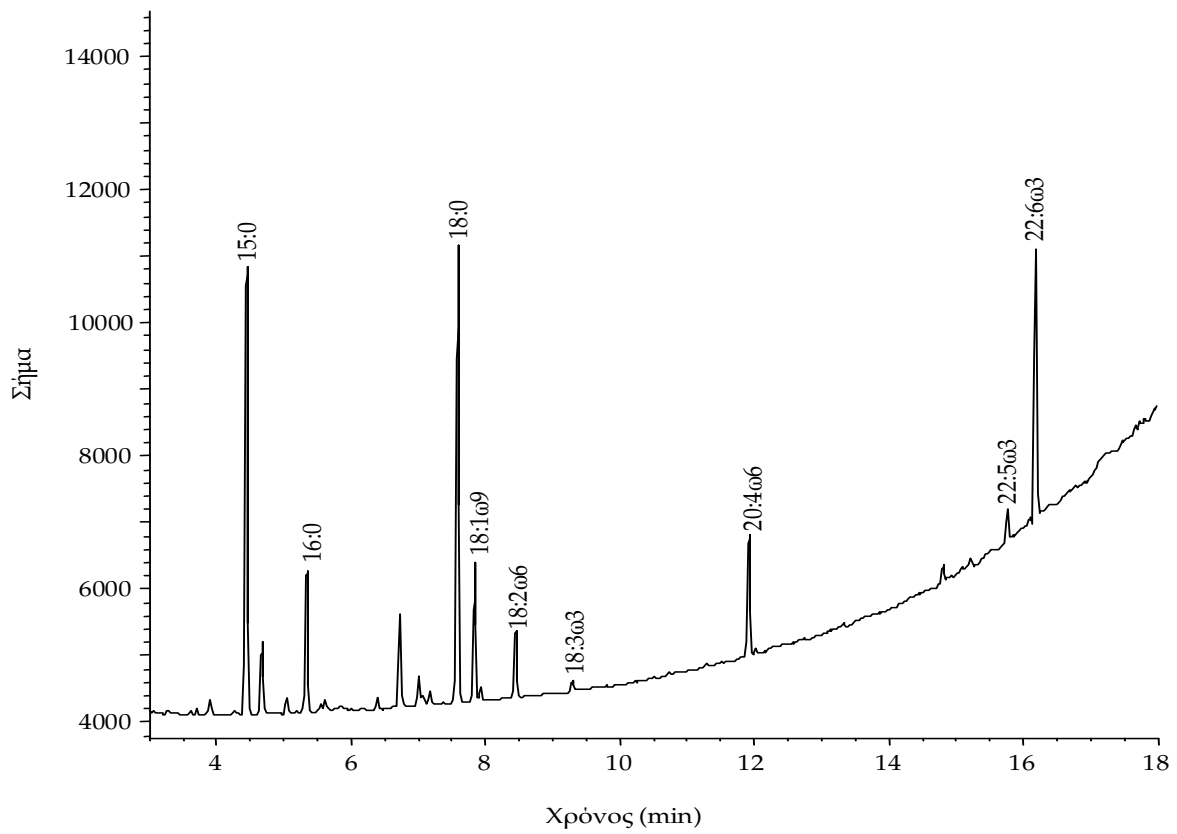
Η σύσταση σε λιπαρά οξέα της διατροφής των πειραματοζώων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Τα πιο άφθονα λιπαρά οξέα ήταν κατά σειρά τα 18:2ω6, 18:1ω9 και 16:0, που συγκέντρωναν το 86% του συνόλου.

Αξιολόγηση της τεχνικής απομόνωσης των μιτοχονδρίων

Ο εμπλουτισμός του μιτοχονδριακού παρασκευάσματος σε CCO (δηλαδή σε μιτοχόνδρια) ως το πηλίκο της ειδικής δραστηριότητας της CCO στα μιτοχόνδρια προς την ειδική δραστηριότητά της στον καρδιακό ιστό ήταν 3 (δεδομένα από τη διπλωματική εργασία της Ελένης Ορφανίδου).



Σχήμα 1. Τυπικός διαχωρισμός φωσφολιπιδίων από μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μυός 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 μύος επιμύων.

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

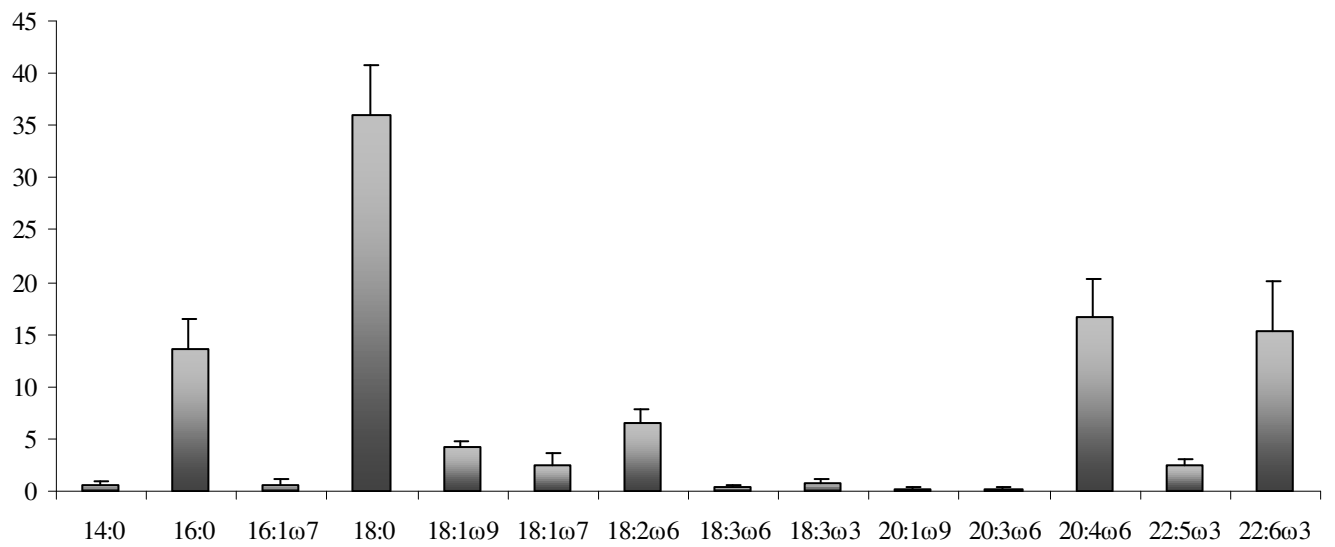
| Λιπαρό οξύ | % |
|-----------------|------|
| 14:0 | 0,9 |
| 16:0 | 18,1 |
| 16:1 ω 7 | 0,6 |
| 18:0 | 4,4 |
| 18:1 ω 9 | 31,5 |
| 18:1 ω 7 | 1,7 |
| 18:2 ω 6 | 36,3 |
| 18:3 ω 3 | 1,4 |
| 20:1 ω 9 | 0,7 |
| 22:5 ω 3 | 0,3 |
| 22:6 ω 3 | 4,7 |

Λιπαρά οξέα φωσφολιπιδίων

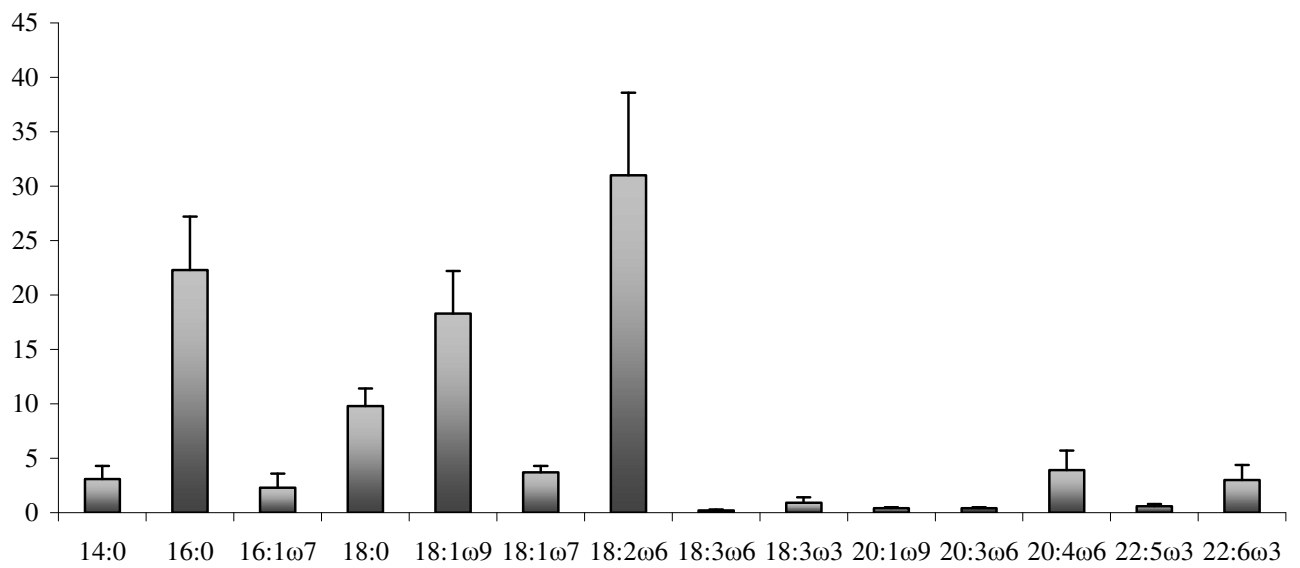
Τα αποτελέσματα που αφορούν τα λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Για μια ευκολότερη σύγκρισή τους τα αποτελέσματα παρουσιάζονται και στα διαγράμματα 1-4. Η σημαντικότητα στις συγκρίσεις του ποσοστού κάθε λιπαρού οξέος σε κάθε δυνατό ζεύγος φωσφολιπιδίων φαίνεται στον πίνακα 3. Στον πίνακα 4 παρουσιάζεται η γραμμομοριακή σύσταση των λιπαρών οξέων ανάλογα με την ακορεστότητά τους και στον πίνακα 5 η σημαντικότητα στις συγκρίσεις του ποσοστού για κάθε ομάδα λιπαρών οξέων (ανάλογα με την ακορεστότητά τους) σε κάθε δυνατό ζεύγος φωσφολιπιδίων.

Πίνακας 2. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των επιμέρους λιπαρών οξέων της φωσφατιδylaιθανολαμίνης, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδyλινοσιτόλης και της λυσοφωσφατιδylaιθανολαμίνης σε καρδιά επίμυος.

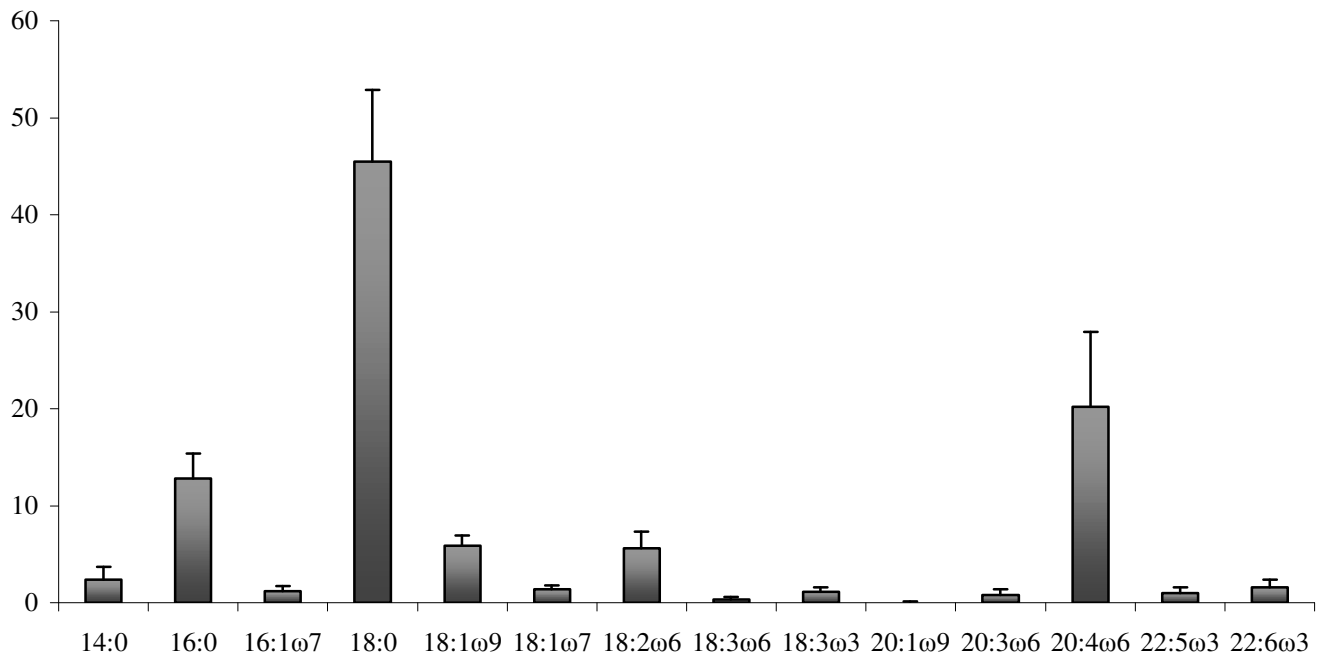
| Λιπαρό οξύ | Φωσφατιδylaιθανολαμίνη | | Καρδιολιπίνη | | Φωσφατιδyλινοσιτόλη | | Λυσοφωσφατιδylaιθανολαμίνη | |
|------------|------------------------|-----|--------------|-----|---------------------|-----|----------------------------|-----|
| | Μέση τιμή | SD | Μέση τιμή | SD | Μέση τιμή | SD | Μέση τιμή | SD |
| 14:0 | 0,5 | 0,4 | 3,1 | 1,2 | 2,4 | 1,3 | 2,8 | 1,5 |
| 16:0 | 13,6 | 2,8 | 22,3 | 4,9 | 12,8 | 2,6 | 23,0 | 2,5 |
| 16:1ω7 | 0,6 | 0,6 | 2,3 | 1,3 | 1,2 | 0,5 | 1,4 | 0,6 |
| 18:0 | 36,0 | 4,7 | 9,8 | 1,6 | 45,5 | 7,4 | 50,5 | 6,7 |
| 18:1ω9 | 4,2 | 0,5 | 18,3 | 3,9 | 5,9 | 1,0 | 7,7 | 2,6 |
| 18:1ω7 | 2,5 | 1,2 | 3,7 | 0,6 | 1,4 | 0,4 | 2,4 | 1,0 |
| 18:2ω6 | 6,6 | 1,2 | 31,0 | 7,6 | 5,6 | 1,7 | 5,7 | 1,9 |
| 18:3ω6 | 0,4 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 0,3 |
| 18:3ω3 | 0,8 | 0,3 | 0,9 | 0,5 | 1,1 | 0,5 | 1,3 | 0,5 |
| 20:1ω9 | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| 20:3ω6 | 0,2 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 0,8 | 0,6 | 0,7 | 0,7 |
| 20:4ω6 | 16,7 | 3,6 | 3,9 | 1,8 | 20,2 | 7,7 | 2,0 | 1,1 |
| 22:5ω3 | 2,4 | 0,7 | 0,6 | 0,2 | 1,0 | 0,6 | 0,1 | 0,2 |
| 22:6ω3 | 15,3 | 4,9 | 3,0 | 1,4 | 1,6 | 0,8 | 1,8 | 1,5 |



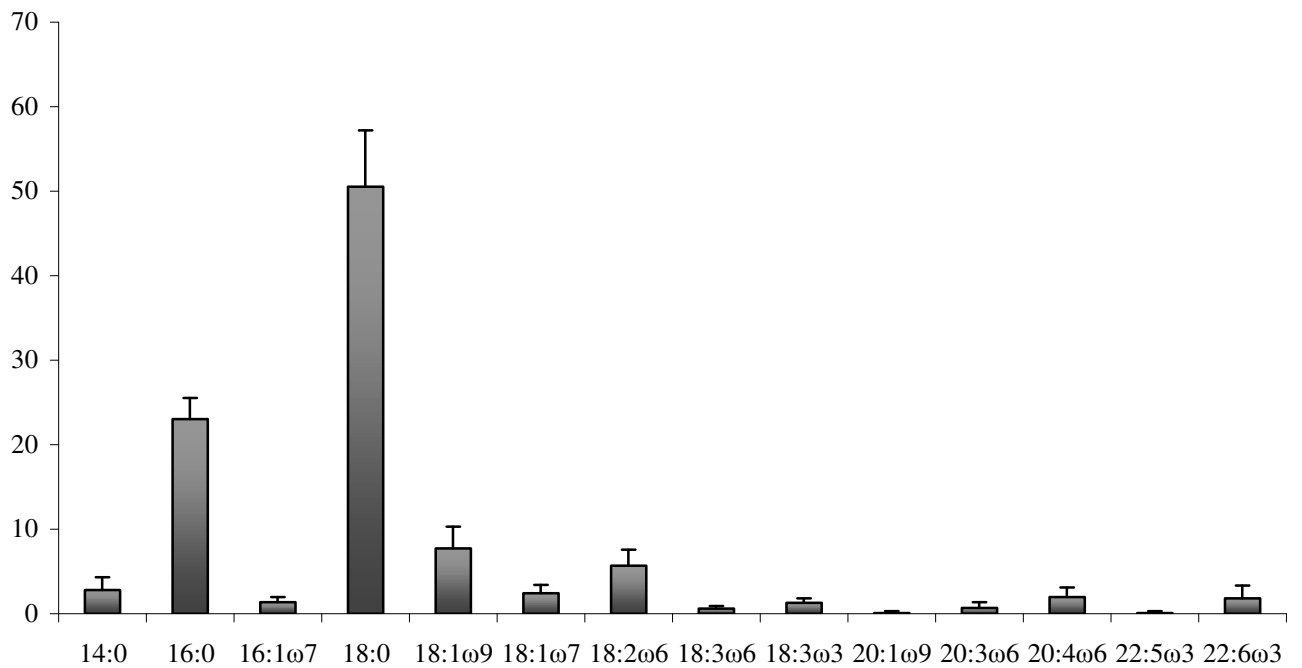
Διάγραμμα 1. Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης



Διάγραμμα 2. Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων της καρδιολιπίνης.



Διάγραμμα 3. Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλινοσιτόλης.



Διάγραμμα 4. Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ζευγαρωτών συγκρίσεων του ποσοστού κάθε λιπαρού οξέος σε κάθε δυνατό ζεύγος φωσφολιπιδίων.

| Λιπαρό οξύ | PE-CL | PE-PI | PE-LPE | CL-PI | CL-LPE | PI-LPE |
|-----------------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|
| 14:0 | *** | *** | ** | | | |
| 16:0 | ** | | *** | *** | | *** |
| 16:1 ω 7 | * | | | | | |
| 18:0 | *** | | ** | *** | *** | * |
| 18:1 ω 9 | *** | *** | ** | *** | *** | |
| 18:1 ω 7 | | * | | *** | * | ** |
| 18:2 ω 6 | *** | | | *** | *** | |
| 18:3 ω 6 | | | | | * | |
| 18:3 ω 3 | | | *** | | | |
| 20:1 ω 9 | * | *** | | *** | * | |
| 20:3 ω 6 | | * | | | | |
| 20:4 ω 6 | *** | | *** | *** | | *** |
| 22:5 ω 3 | *** | ** | *** | | ** | *** |
| 22:6 ω 3 | *** | *** | *** | | | |

* $p < 0,05$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

Πίνακας 4. Ποσοστιαία γραμμικομετρική σύσταση λιπαρών οξέων ανάλογα με την ακορεστότητά τους (τιμές ± SD)

| Λιπαρά οξέα | Φωσφατιδυλαιθανολαιμίνη | | Καρδιολιπίνη | | Φωσφατιδυλινοσιτόλη | | Λυσοφωσφατιδυλαιθανολαιμίνη | |
|------------------------|-------------------------|-----|--------------|-----|---------------------|------|-----------------------------|-----|
| | Μέση τιμή | SD | Μέση τιμή | SD | Μέση τιμή | SD | Μέση τιμή | SD |
| Κορεσμένα | 50,2 | 7,4 | 35,3 | 6,5 | 60,8 | 10,1 | 76,3 | 8,1 |
| Πολυακόρεστα | 42,4 | 7,9 | 40,1 | 8,7 | 30,6 | 9,3 | 12,0 | 4,4 |
| Πολυακόρεστα ω6 | 23,9 | 2,9 | 35,7 | 8,0 | 26,9 | 9,1 | 8,9 | 2,9 |
| Πολυακόρεστα ω3 | 18,5 | 5,2 | 4,4 | 1,6 | 3,7 | 1,2 | 3,1 | 1,9 |
| Μονοακόρεστα | 7,5 | 1,4 | 24,6 | 3,7 | 8,6 | 1,3 | 11,6 | 3,9 |
| ω6/ω3 | 1,4 | 0,3 | 8,8 | 3,1 | 7,7 | 3,0 | 3,6 | 2,0 |
| Ακόρεστα/ κορεσμένα | 1,0 | 0,3 | 1,9 | 0,5 | 0,7 | 0,3 | 0,3 | 0,1 |
| UI* | 17,7 | 3,8 | 11,6 | 2,0 | 11,1 | 3,3 | 4,5 | 1,8 |

*UI: Δείκτης ακορεστότητας

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ζευγαρωτών συγκρίσεων για κάθε ομάδα λιπαρών οξέων (ανάλογα με την ακορεστότητά τους) σε κάθε δυνατό ζεύγος φωσφολιπιδίων.

| Λιπαρά οξέα | PE-CL | PE-PI | PE-LPE | CL-PI | CL-LPE | PI-LPE |
|------------------------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|
| Κορεσμένα | *** | * | *** | *** | *** | *** |
| Μονοακόρεστα | *** | | * | *** | *** | * |
| Πολυακόρεστα ω6 | *** | | *** | | *** | *** |
| Πολυακόρεστα ω3 | *** | *** | *** | | | |
| Πολυακόρεστα | | * | *** | | *** | *** |
| ω6/ω3 | *** | *** | ** | | *** | * |
| ακόρεστα/ κορεσμένα | *** | * | *** | *** | *** | *** |
| UI | *** | ** | *** | | *** | *** |

* $p < 0,05$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

Εκατοστιαία κατανομή φωσφολιπιδίων

Η ποσοστιαία γραμμομοριακή κατανομή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης στο σύνολο των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων παρουσιάζεται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Ποσοστιαία γραμμομοριακή κατανομή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της καρδιολιπίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης στα μιτοχόνδρια της καρδιάς επίμυος.

| Φωσφολιπίδιο | % | SD |
|----------------------------|------|-----|
| Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη | 22,5 | 3,2 |
| Καρδιολιπίνη | 12,9 | 4,8 |
| Φωσφατιδυλινοσιτόλη | 3,6 | 0,8 |
| Λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη | 6,5 | 2,7 |

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα εξέτασε το προφίλ λιπαρών οξέων τεσσάρων φωσφολιπιδίων στα μιτοχόνδρια καρδιάς, 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.

Ο εμπλουτισμός του παρασκευάσματός μας σε μιτοχόνδρια κατά 3 περίπου φορές κρίνεται ικανοποιητικός.

Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη ήταν το δεύτερο αφθονότερο φωσφολιπίδιο μετά την φωσφατιδυλοχολίνη (δεδομένο από τη μεταπτυχιακή διατριβή του Θεοφιλίδη Γιώργου), αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με έρευνα των Kalofoutis και συν. (1981) σε μιτοχόνδρια καρδιακού μυός επιμύων. Σε σύγκριση με τη βιβλιογραφία το ποσοστό της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (22,5%) ήταν χαμηλότερο. Οι Kalofoutis και συν. (1981) αναφέρουν ποσοστό 32,52%. Το ποσοστό της φωσφατιδυλινοσιτόλης (3,6%) ήταν ίδιο με αυτό που αναφέρεται στην παραπάνω έρευνα. Η καρδιολιπίνη αποτέλεσε το 12,9% των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων. Η βιβλιογραφία δεν αναφέρει ποσοστά καρδιολιπίνης σε καρδιακά μιτοχόνδρια κι έτσι δε μπορούμε να συγκρίνουμε το ποσοστό αυτό με άλλη έρευνα. Ωστόσο, οι Roquelin και συν. (1981) βρήκαν ποσοστό σε ολικό καρδιακό ιστό 11,6% και οι Liang και συν. (1992) 16%. Η ίδια αδυναμία της βιβλιογραφίας υπάρχει και στην λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη, για την οποία δεν έχουμε συγκριτικά ποσοστά.

Ενδιαφέρον έχει η σύγκριση της ποσοστιαίας κατανομής των παραπάνω φωσφολιπιδίων στα μιτοχόνδρια με την ποσοστιαία κατανομή τους σε ολικό ιστό. Στην παρούσα έρευνα δεν πραγματοποιήσαμε αναλύσεις σε ολικό ιστό, η ανάλυσή τους όμως θα αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε μελλοντική έρευνα του εργαστηρίου μας.

Περνώντας στο κύριο αντικείμενο της έρευνάς μας, δηλαδή την ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης, της καρδιολιπίνης και της λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνης των μιτοχονδρίων, επισημαίνουμε ότι είναι αδύνατη η σύγκριση με τη βιβλιογραφία, αφού δεν έχουμε υπόψη κάποια σχετική μελέτη. Έτσι θα περιοριστούμε στο σχολιασμό των δικών μας αποτελεσμάτων.

Το πιο εντυπωσιακό εύρημά μας είναι το εντελώς ξεχωριστό προφίλ κάθε φωσφολιπιδίου. Το προφίλ αυτό μπορεί επιγραμματικά να συνοψιστεί ως εξής:

- ❖ Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη χαρακτηρίζεται κυρίως από μεγάλο ποσοστό στα πολύ μακράς αλύσου πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (κατά σειρά 22:6ω3 και 22:5ω3).
- ❖ Η καρδιολιπίνη είχε μεγάλο ποσοστό 18:2ω6 και 18:1ω9.
- ❖ Η φωσφατιδυλινοσιτόλη είχε μεγάλο ποσοστό 18:0 και 20:4ω6.
- ❖ Η λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη είχε μεγάλο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων.

Το παραπάνω προφίλ φαίνεται να επηρεάζεται εν μέρει από τη σύσταση της διατροφής (όπου κυριαρχούσαν κατά σειρά τα 18:2ω6, 18:1ω9 και 16:0), αφού τα τρία αυτά λιπαρά οξέα ήταν τα πιο άφθονα στην καρδιολιπίνη. Ωστόσο, το γεγονός ότι δεν ήταν τα κύρια λιπαρά οξέα στα άλλα τρία φωσφολιπίδια (με εξαίρεση το 16:0, που όμως είναι τελικό προϊόν της σύνθεσης λιπαρών οξέων από τη συνθάση λιπαρού οξέος και αφθονεί γενικώς) δείχνει ότι κυρίαρχο ρόλο στο προφίλ λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων παίζει η εκλεκτικότητα των ενζύμων που τα συνθέτουν ή/και τα αποδομούν. Είναι εντυπωσιακό ότι τα ένζυμα αυτά δεν περιορίζουν την εκλεκτικότητά τους στην πολική κεφαλή του φωσφολιπιδίου, (η οποία θα περιέμενε 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.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Andersen BT, Rizzo MA, Shome K, Romero G (2002). The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett* **531**, 65-68.

Ayre KJ, Hulbert AJ (1997). Dietary fatty acid profile affects endurance in rats. *Lipids* **32**, 1265-1270.

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.

Charnock JS, McLennan PL, Abeywardena MY (1992). Dietary modulation of lipid metabolism and mechanical performance of the heart. *Mol and Cell Biochem* **116**, 19-25.

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

Cleland PJ, Appleby GJ, Rattigan S, Clark MG (1989). Exercise-induced translocation of protein kinase C and production of diacylglycerol and phosphatidic acid in rat skeletal muscle in vivo. Relationship to changes in glucose transport. *J Biol Chem* **25**, 17704-17711.

Daum G (1985). Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **822**, 1-42.

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.

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

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

Gutierrez AM, Reboredo GR, Arcemis CJ, Catala A (2000). Non-enzymatic lipid peroxidation of microsomes and mitochondria isolated from liver and heart of pigeon and rat. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 73-79.

Haines TH, Dencher NA (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **528**, 35-39.

Han X, Abendschein DR, Kelley JG, Gross RW (2000). Diabetes-induced changes in specific lipid molecular species in rat myocardium. *Biochem J* **352**, 79-89.

Helge JW, Storlien LH (1999). Muscle membranes, diet, and exercise. In *Biochemistry of Exercise*. Ed. M Hargreaves, M Thompson, pp. 57-67. Champaign, IL: Human Kinetics.

Helge JW, Wu BJ, Willer M, Daugaard JR, Storlien LH, Kiens B (2001). Training affects muscle phospholipid fatty acid composition in humans. *J Appl Physiol* **90**, 670-677.

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* **199**, 257-274.

Kalofoutis A, Lekakis J, Miras C (1980). Heart mitochondrial and microsomal phospholipid fluctuations induced by chronic exercise in rats. *Int J Biochem* **13** 195-199.

Keatisuwan W, Kinjo M, Koyama T (1999). Changes in phospholipid constituents in mitochondrial membranes after long lasting exercise in rat heart. *Life Sci* **48**, 2173-2181.

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

Liang MTC, Glonec T, Meneses P, Kopp SJ, Paulson DJ, Gierke LW, Schwartz FN (1992). NMR spectroscopy study of heart phospholipids. *Int J Sports Med* **13**, 417-423.

Liang MTC, Meneses P, Glonek T, Kopp SJ, Paulson DJ, Schwartz FN, Gierke LW (1992). Effects of exercise training and anabolic steroids on plantaris and soleus phospholipids: a ^{31}P nuclear magnetic resonance study. *Int J Sports Med*, **13**, 417-423.

McKenzie DJ, Higgs DA, Dosanjh BS, Deacon G, Randall DJ (1998). Dietary fatty acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater. *Fish Physiol Biochem* **19**, 111-122.

Moore RL (1998). Cellular adaptations of the heart muscle to exercise training. *Ann Med* **30**, 46-53.

Mougiou V, Kotzamanidis C, Koutsari C, Atsopardis S (1995). Exercise-induced changes in the concentration of individual fatty acids and triacylglycerols of human plasma. *Metabolism* **44**, 681-688.

Olsson NU, Salem NJr (1997). Molecular species analysis of phospholipids. *J Chromatogr* **692**, 245-256.

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

Pierce GN, Sekhon PS, Meng HP, Maddaford TG (1989). Effects of chronic swimming training on cardiac sarcolemmal function and composition. *J Appl Physiol* **66**, 1715-1721.

Rocquelin G, Juaneda P, Cluzan R (1981). Influence of physical training on the effects of dietary oils on cardiac morphology and phospholipids in rats. *Ann Nutr Metab* **25**, 350-361.

Terblanche SE, Gohil K, Packer L, Henderson S, Brooks GA (2001). The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). *Comp Biochem Physiol* **128**, 889-896.

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

van der Vusse GJ, Reneman RS (1996). Lipid metabolism in muscle. In *Handbook of Physiology: Regulation and Integration of Multiple Systems*, ed. LB Rowell, JT Shepherd, pp. 1075-1123. Oxford University Press, New York.

Voelker DR (1991). Lipid assembly into cell membranes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, ed. DE Vance, J Vance, pp. 489-523. Elsevier, Amsterdam.

Yamauchi T, Ohki K, Maruyama H, Nozawa Y (1981). Thermal adaptation of Tetrahymena membranes with special reference to mitochondria. Role of cardiolipin in fluidity of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* **649**, 385-392.