

Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΤΟΥ ΦΩΣΦΑΤΙΔΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΤΗΣ  
ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΛΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΙΝΟΣΙΤΟΛΗΣ ΚΑΙ  
ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΟΛΙΠΙΝΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ  
ΜΥΟΣ ΕΠΙΜΥΩΝ

της  
Σοφίας Γ. Τσαλουχίδου

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 (Άσκηση και Υγεία)

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

---

© 2004  
Σοφία Γ. Τσαλουχίδου  
ALL RIGHTS RESERVED

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Είναι εξαιρετικά δύσκολο για μένα να εκφράσω μέσα σε λίγες λέξεις αυτά που νιώθω για τους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου σε όλη την διάρκεια αυτής της προσπάθειας. Από την πρώτη στιγμή σύλληψης της ιδέας μέχρι και τώρα που βλέπω τη δουλειά αυτή να ολοκληρώνεται οι στιγμές χαράς αλλά και οι δυσκολίες ήταν πολλές.

Οι δυσκολίες ξεπεράστηκαν και οι στιγμές χαράς γίνανε ακόμη πιο πολλές με την παρουσία του επιβλέποντα καθηγητή μου Βασίλη Μούγιου. Σε όλες τις φάσεις της παρούσας εργασίας, ο Δρ Βασίλης Μούγιος ήταν πάντα κοντά μου, με αμέτρητες ώρες υπομονής, αισιοδοξίας και ανεκτίμητης βοήθειας. Για δεύτερη φορά, με πρώτη αυτή της διπλωματικής μου εργασίας, με έκανε να πιστέψω ακόμη περισσότερο στις δυνατότητές μου και να ανέβω ένα ακόμη σκαλοπάτι γνώσης. Από τα βάθη της καρδιάς μου, θέλω να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για όλα όσα μου πρόσφερε και μου δίδαξε.

Πολύτιμη στάθηκε για μένα και η βοήθεια του Μιχάλη Νικολαΐδη και της Ανατολής Πετρίδου, που από την πρώτη κιόλας στιγμή, οι απόψεις μας ταυτίστηκαν, δημιουργώντας πάντα ένα ευχάριστο κλίμα φιλίας και συνεργασίας.

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 και τον αδελφό μου για την καθημερινή τους συμπαράσταση σε όλες τις δύσκολες στιγμές.

Σ.Τ., Θεσσαλονίκη, 7/6/2004

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σοφία Γ. Τσαλουχίδου

Η σύσταση σε λιπαρά οξέα του φωσφατιδικού οξέος, της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης 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 ζώικών 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 του φωσφατιδικού οξέος, της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης 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. Φωσφατιδικό οξύ δεν ανιχνεύσαμε. Βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών άλλων 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 φωσφατιδυλινοσιτόλη είχε κυρίως κορεσμένα λιπαρά οξέα (κατά σειρά 18:0 και 16:0) και η καρδιολιπίνη είχε μεγάλο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 18:1ω9). Οι τόσο έντονες διαφορές στο προφίλ λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων ενισχύουν τη σημασία των επιμέρους λιπαρών οξέων στις κυτταρικές λειτουργίες.

## ABSTRACT

Sophia G. Tsalouchidou

Fatty acid composition of phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol and cardiolipin 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 phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol and cardiolipin 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 did not detect phosphatidic acid. We found significant differences among the three other 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 $\omega$ 3), phosphatidylinositol contained mainly saturated fatty acids (18:0 followed by 16:0) and cardiolipin had a high percentage of monounsaturated fatty acids (mainly 18:1 $\omega$ 9). These major differences in the fatty acid profile of phospholipids underline the importance of individual fatty acids in cellular functions.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....   | 1  |
| ABSTRACT.....   | 2  |
| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....  | 3  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....  | 5  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....   | 5  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....   | 5  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ.....   | 6  |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....   | 7  |
| Το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για την επίδραση της άσκησης στη<br>σύσταση των ιστών σε φωσφολιπίδια και στη σύσταση των φωσφολιπιδίων σε<br>λιπαρά..... | 7  |
| Η ενασχόληση του εργαστηρίου μας.....   | 8  |
| Σημασία του διαχωρισμού υποκυτταρικών κλασμάτων.....  | 9  |
| Σημασία του διαχωρισμού των επιμέρους φωσφολιπιδίων.....  | 10 |
| Δομή των λιπαρών οξέων.....   | 11 |
| Οικογένειες λιπαρών οξέων.....  | 13 |
| Ρόλος λιπαρών οξέων.....  | 13 |
| Δομή των φωσφολιπιδίων.....   | 15 |
| Βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδριακών μεμβρανών.....  | 16 |
| Φυσιολογικός ρόλος φωσφολιπιδίων.....   | 19 |
| Φυσιολογικός ρόλος των φωσφολιπιδίων που εξετάστηκαν.....   | 19 |
| Επηρεασμός της λειτουργίας των μεμβρανών από τη σύσταση τους σε λιπαρά<br>οξέα.....   | 22 |
| Χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων και η πλαστικότητα τους στην άσκηση<br>αντοχής.....   | 24 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....   | 26 |
| Προκαταρκτικές μεθοδολογικές παρατηρήσεις.....  | 26 |
| Έρευνες στον άνθρωπο.....   | 28 |
| Έρευνες σε πειραματόζωα.....  | 29 |
| ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....   | 32 |



|  |    |
|--|----|
| ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....                         | 32 |
| ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....                                 | 33 |
| Πειραματόζωα.....                                | 33 |
| Συλλογή μυών.....                                | 33 |
| Ομογενοποίηση.....                               | 34 |
| Απομάκρυνση μυοϊνιδίων και πυρήνων.....          | 34 |
| Καταβύθιση μιτοχονδρίων.....                     | 35 |
| Εκχύλιση λιπιδίων.....                           | 35 |
| Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.....               | 36 |
| Αέρια χρωματογραφία.....                         | 37 |
| Στατιστική ανάλυση.....                          | 40 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....                                | 42 |
| Διατροφή.....                                    | 42 |
| Αξιολόγηση τεχνικής απομόνωσης μιτοχονδρίων..... | 42 |
| Λιπαρά οξέα φωσφολιπιδίων.....                   | 45 |
| Φωσφολιπίδια.....                                | 53 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....                                    | 54 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....                                | 57 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 1. Ποσοστιαία γραμμομοριακή σύσταση της τροφής των επιμύων.....   | 45 |
| Πίνακας 2. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των επιμέρους λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης στα μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μύος επίμυος..... | 46 |
| Πίνακας 3. Δείκτες του προφίλ λιπαρών οξέων στα τρία φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μύος επίμυος.....  | 51 |
| Πίνακας 4. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, φωσφατιδυλινοσιτόλης και καρδιολιπίνης σε μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μύος επίμυος.....  | 52 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Γράφημα 1. Συντακτικοί τύποι του παλμιτικού οξέους (16:0) και του ελαϊκού οξέος (18:1ω9)..... | 12 |
| Γράφημα 2α. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδίου οξέος.....                                     | 17 |
| Γράφημα 2β. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδυλαιθανολαμίνης.....                               | 17 |
| Γράφημα 2γ. Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδυλινοσιτόλης.....                                  | 17 |
| Γράφημα 2δ. Σχηματική αναπαράσταση καρδιολιπίνης.....   | 18 |
| Γράφημα 3. Επίπεδα προσδιορισμού της σύστασης ενός ιστού σε λιπαρά οξέα.                      | 27 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Σχήμα 1. Τυπικός διαχωρισμός φωσφολιπιδίων από μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μύος επιμύων με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας .....                                  | 43 |
| Σχήμα 2. Τυπικό χρωματογράφημα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων προερχόμενων από φωσφολιπίδιο (φωσφατιδυλαιθανολαμίνη) μιτοχονδρίων γαστροκνημίου μύος επιμύων..... | 44 |
| Σχήμα 3. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης.....   | 50 |
| Σχήμα 4. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλινοσιτόλης...  | 50 |
| Σχήμα 5. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της καρδιολιπίνης.....   | 50 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| CCO | Οξιδάση του κυτοχρώματος c          |
| LPC | Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη               |
| SM  | Σφιγγομυελίνη                       |
| PC  | Φωσφατιδυλοχολίνη                   |
| LPE | Λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη          |
| PI  | Φωσφατιδυλινοσιτόλη                 |
| PS  | Φωσφατιδυλοσερίνη                   |
| PE  | Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη              |
| CL  | Καρδιολιπίνη                        |
| A/K | Ακόρεστα προς κορεσμένα λιπαρά οξέα |
| ΔΑ  | Δείκτης ακορεστότητας               |



**Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΤΟΥ ΦΩΣΦΑΤΙΔΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΤΗΣ  
ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΛΙΘΑΝΟΛΑΜΙΝΗΣ, ΤΗΣ ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΙΝΟΣΙΤΟΛΗΣ ΚΑΙ  
ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΟΛΙΠΙΝΗΣ ΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟΥ  
ΜΥΟΣ ΕΠΙΜΥΩΝ**

*Το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για την επίδραση της άσκησης στη σύσταση των ιστών σε φωσφολιπίδια και στη σύσταση των φωσφολιπιδίων σε λιπαρά οξέα*

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 & Bezuglon 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 μύος (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 (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 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*

Αυτό το διάστημα εκπονούνται δύο διδακτορικές διατριβές 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 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. 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 (Hoppeler & 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



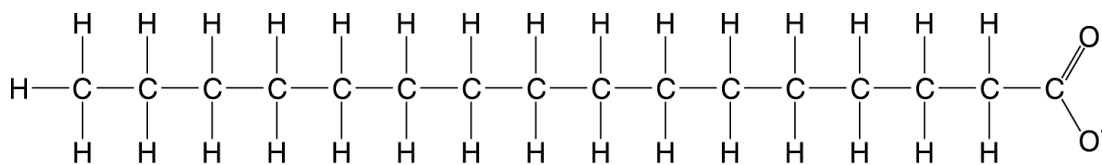
μιας διαφοροποίησης στο προφίλ κάποιου άλλου φωσφολιπιδίου ή σε εξαγωγή λανθασμένων συμπερασμάτων. Έτσι λοιπόν κρίνεται αναγκαίος και ο διαχωρισμός των επιμέρους φωσφολιπιδίων. Ο διαχωρισμός αυτός θα επιτρέψει να περιγραφούν λεπτομερώς οι επιδράσεις της άσκησης στη σύσταση του μυός σε λιπαρά οξέα. Ο 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.

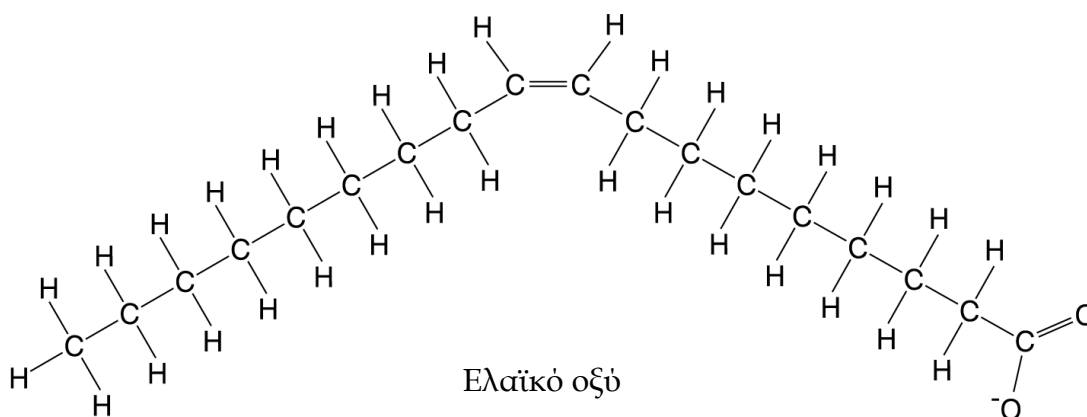
#### *Δομή των λιπαρών οξέων*

Τα λιπαρά οξέα αποτελούνται από μια υδρογονανθρακική 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 μεταβολικά σχετιζόμενων λιπαρών οξέων, αφού οι αντιδράσεις επιμήκυνσης και αποδόμησης λαμβάνουν χώρα στο άλλο άκρο. Το

ελαϊκό οξύ, σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης  $\omega$ , συμβολίζεται 18:1 $\omega$ 9. 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  $\Delta$  ακολουθούμενο από έναν εκθέτη που αντιστοιχεί στο άτομο άνθρακα μετά το οποίο εμφανίζεται ο διπλός δεσμός, όταν κάποιος ξεκινάει την αρίθμηση από το καρβοξυλικό άκρο. Επομένως, το ελαϊκό οξύ έχει ένα  $\Delta^9$  δεσμό.

#### *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 ή μη εστεροποιημένη μορφή. Τα περισσότερα είναι στην πραγματικότητα ακυλομάδες

(προέρχονται από τα λιπαρά οξέα με την απομάκρυνση του O<sup>-</sup> 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 18:3ω3 και το 20:4ω6 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 εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (22:6ω3) και χρησιμεύουν ως δομικοί συμπαράγοντες για τη 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 είχαν υψηλές συγκεντρώσεις εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος 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 της ποσοστιαίας κατανομής 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 (Γράφημα 2α).

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. Ανάλογα με την αλκοόλη, διακρίνουμε τα αντίστοιχα γλυκεροφωσφολιπίδια όπως τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλινοσιτόλη (Γράφημα 2β και 2γ).

Μοναδική μεταξύ των γλυκεροφωσfolιπιδίων, από άποψη δομής, θεωρείται η καρδιολιπίνη, αφού αποτελείται από δύο φωσφατιδικά οξέα συνδεδεμένα με μία γλυκερόλη (Γράφημα 2δ).

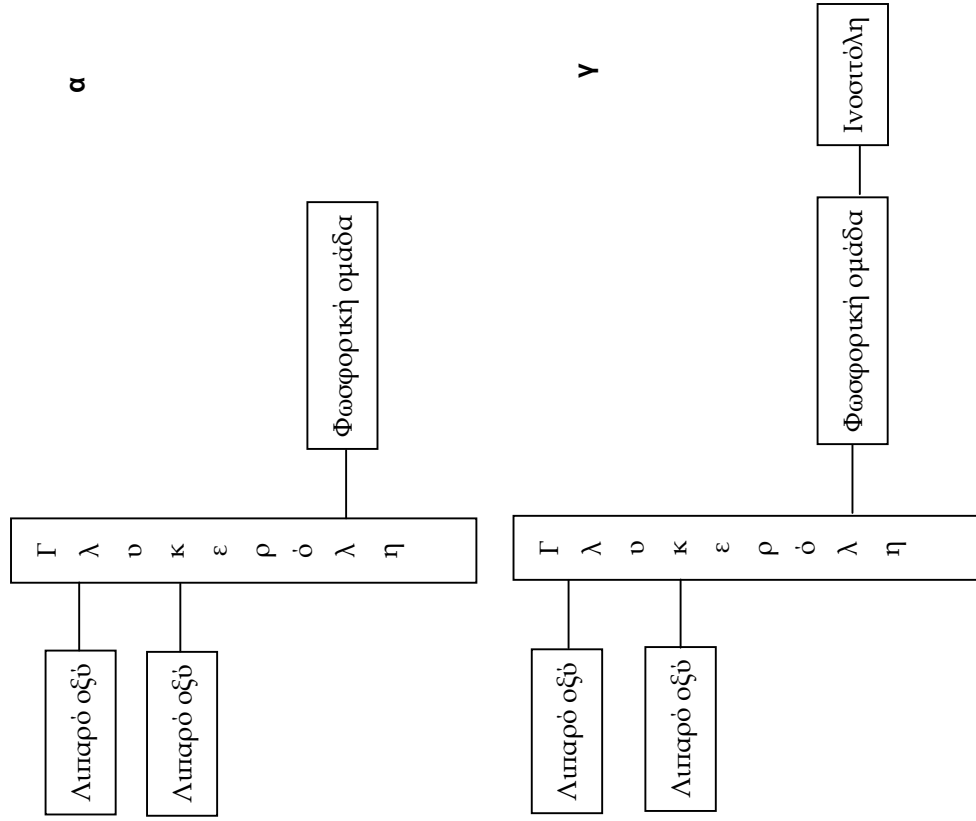
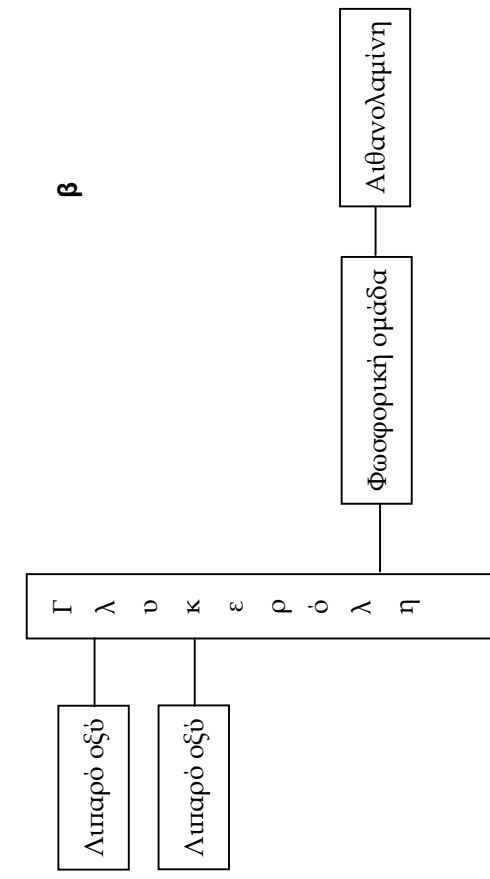
#### *Βιοσύνθεση των φωσfolιπιδίων των μιτοχονδριακών μεμβρανών*

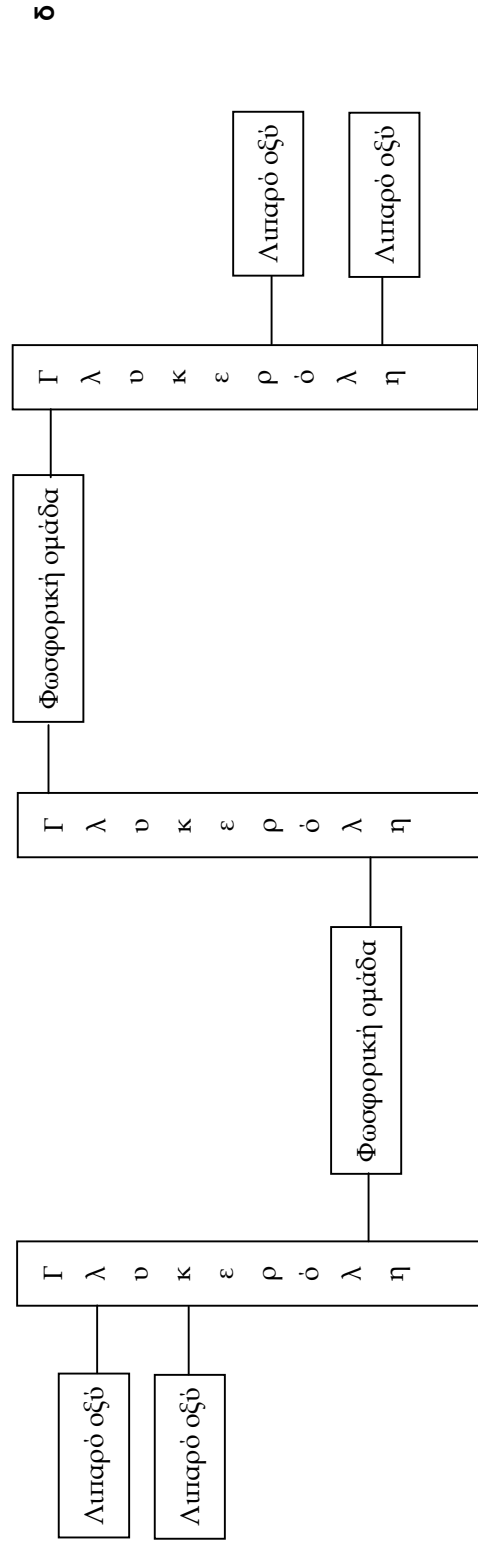
Για τη σύνθεση των φωσfolιπιδίων απαιτείται σύνδεση μιας διακυλογλυκερόλης και μιας αλκοόλης. Όπως σε όλες τις αναβολικές διεργασίες, μία τουλάχιστον από τις δύο ενώσεις πρέπει να είναι ενεργοποιημένη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορεί και οι δύο ενώσεις να είναι ενεργοποιημένες, ανάλογα με τη φύση των αντιδρώντων.

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι ξεκινά με την αντίδραση του φωσφατιδικού οξέος με την τριφωσφορική κυτιδίνη (cytidine triphosphate, CTP), με προϊόν την κυτιδυλοδιφωσφορική διακυλογλυκερόλη (CDP-diacylglycerol). 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 φωσfolιπίδια (Berg et al. 2001). Στην πλειοψηφία τη θέση 1 της γλυκερόλης καταλαμβάνουν κορεσμένα λιπαρά οξέα ενώ τη θέση 2 ακόρεστα (Schiller & Arnold 2002).





**Γράφημα 2.** Σχηματική αναπαράσταση φωσφατιδικού οξέος (α), φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (β), φωσφατιδυλινωσιτόλης (γ) και καρδιολιπίνης (δ).



### *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 τρισφωφορική 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*

Το φωσφατιδικό οξύ είναι ένας σημαντικός μεταβολίτης που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση των φωσφολιπιδίων και στην ανακατασκευή των μεμβρανών.

Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το φωσφατιδικό οξύ μπορεί να ασκήσει βασικό ρόλο στη ρύθμιση αρκετών σημαντικών βιολογικών διαδικασιών. Για παράδειγμα, συμμετέχει στη ρύθμιση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών, στην ενεργοποίηση οξειδωτικών διαδικασιών και στη μεταφορά των νεοσχηματισμένων λιπιδίων που προορίζονται για τις κυτταρικές μεμβράνες (Andersen et al. 2002). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις

ότι μπορεί να αντικαταστήσει τη διακυλογλυκερόλη και να ενεργοποιήσει την πρωτεϊνική κινάση C (Cleland et al. 1989).

Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελεί ένα από τα κυριότερα φωσφολιπίδια των μιτοχονδριακών μεμβρανών και αποτελεί το δεύτερο (μετά τη φωσφατιδυλοχολίνη) αφθονότερο φωσφολιπίδιο (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 προσταγλανδινών (Choy et al. 1997). Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη συμμετέχει στις αλλαγές που συμβαίνουν στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης και συγκεκριμένα κατά το τελικό στάδιο της μίτωσης (Emoto & Umeda 2001).

Η φωσφατιδυλινοσιτόλη αντιπροσωπεύει περίπου το 5% των συνολικών φωσφολιπιδίων στις μιτοχονδριακές μεμβράνες (Daum 1985). Η εμπλοκή της στην πρόσδεση πρωτεϊνών στις μεμβράνες και σε ρυθμιστικές διαδικασίες, όπως η κυτταρική σηματοδότηση, 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 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. 1981).

Η καρδιολιπίνη είναι το πρώτο φωσφολιπίδιο που χαρακτηρίστηκε χημικά και 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 την διάρκεια όλης της ζωής του κυττάρου (Haines & Dencher 2002). Χαρακτηριστικό της καρδιολιπίνης είναι ότι έχει σχεδόν διπλάσιο μέγεθος από τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια.

Αντιπροσωπεύει το 10-20% των συνολικών μιτοχονδριακών φωσφολιπιδίων, με εξαίρεση τα μιτοχόνδρια του εγκεφάλου των επιμύων, τα οποία περιέχουν αισθητά 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 οξιδάση του κυτοχρώματος c (CCO, 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, διαύλοι 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 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 με πολλές πτυχώσεις 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 και κυρίως υδατάνθρακες και λιπίδια, καθώς και οξυγόνο.

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν DNA, συνήθως σε κυκλική μορφή, το οποίο κωδικοποιεί και συνθέτει 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.

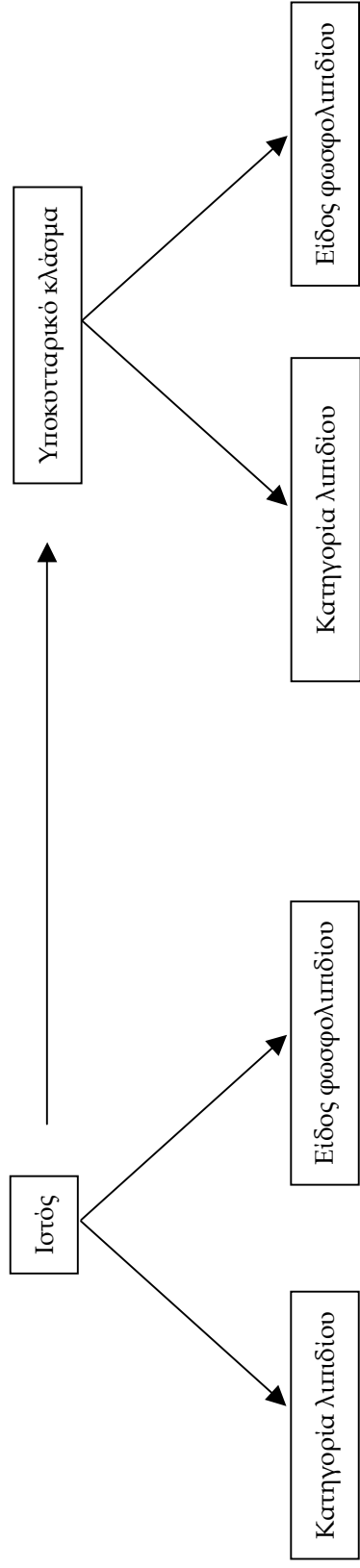
## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ**

### *Προκαταρκτικές μεθοδολογικές παρατηρήσεις*

Η βιβλιογραφία που θα ανασκοπηθεί αναφέρεται τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Αξιόπιστα δεδομένα στον άνθρωπο είναι λιγότερο εύκολο να αποκτηθούν, μια και η διατροφή (μάλλον ο ισχυρότερος φυσιολογικός τροποποιητής της σύστασης σε λιπαρά οξέα) είναι δύσκολο να ελεγχθεί σε άτομα που ζουν ελεύθερα. Επιπλέον, τα πειραματόζωα προσφέρουν τη δυνατότητα μελέτης ιστών που είναι δύσκολο ή αδύνατο να ληφθούν από ζωντανό άνθρωπο. Ωστόσο, θα πρέπει να είναι κανείς 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 λεπτομερέστερη 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 δύο προηγούμενων προσεγγίσεων (δηλαδή κλασματοποίηση του ιστού και διαχωρισμός των κατηγοριών λιπιδίων σε κάθε υποκυτταρικό κλάσμα) αποφέρει την πιο λεπτομερειακή πληροφόρηση. Η συντριπτική πλειονότητα των μελετών που





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

θα ανασκοπηθούν έχουν υιοθετήσει μία από τις δύο ενδιάμεσες προσεγγίσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι, αν περιλαμβάνεται και ανάλυση φωσφολιπιδίων, κάποιος μπορεί να πάει ακόμη βαθύτερα διαχωρίζοντας τα επιμέρους φωσφολιπίδια.

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 επιμέρους φωσφολιπίδια 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*

Έρευνα σε άρρενες ηλικίας 5-55 ετών βρήκε ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη ήταν 24%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη 9% και η καρδιολιπίνη 10% των ολικών φωσφολιπιδίων του σκελετικού μυός (Bruce 1974a). Σε άλλη δημοσίευση από τον ίδιο ερευνητή (Bruce 1974b), το προφίλ λιπαρών οξέων βρέθηκε σημαντικά διαφορετικό μεταξύ των παραπάνω φωσφολιπιδίων.

Συγκεκριμένα, στην καρδιολιπίνη κυριαρχούσε το λινελαϊκό οξύ (18:2 $\omega$ 6, 84% των ολικών λιπαρών οξέων), ενώ το ίδιο λιπαρό οξύ στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη κατείχε το 18% και στη φωσφατιδυλινοσιτόλη μόλις το 6%. Μεγάλες διαφορές παρατηρήθηκαν και στο στεατικό (18:0), που αποτελούσε το αφθονότερο λιπαρό οξύ στη φωσφατιδυλινοσιτόλη (46%), ενώ

στην καρδιολιπίνη αποτελούσε μόλις το 1%. Τέλος, το 20:4ω6 αποτελούσε ένα από τα αφθονότερα λιπαρά οξέα στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και στη φωσφατιδυλινοσιτόλη, ενώ μόλις το 1% στην καρδιολιπίνη.

#### *Έρευνες σε πειραματόζωα*

Εντοπίσαμε μία μόνο έρευνα που ανίχνευσε φωσφατιδικό οξύ σε ολικό ιστό γαστροκνημίου μυός επιμών. Συγκεκριμένα το φωσφατιδικό οξύ είχε 28% 16:0, 39% 18:0, 27% 18:2ω6 και 7% 20:4ω6 (Cleland et al. 1989). Οι Masoro και συν. (1967) μέτρησαν τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, τη φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη σε γαστροκνήμιο μυ επίμυος. Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 25%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 6% και η καρδιολιπίνη το 3% των συνολικών φωσφολιπιδίων. Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους ίδιους ερευνητές σε γαστροκνήμιο μυ πιθήκων βρήκε ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 25%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 7% και η καρδιολιπίνη το 3% των συνολικών φωσφολιπιδίων (δηλαδή ποσοστά όμοια με αυτά των επιμύων). Εδώ αξίζει να σημειωθεί η διαφορετική σύσταση των παραπάνω φωσφολιπιδίων σε λιπαρά οξέα. Συγκεκριμένα το 18:2ω6, αφθονούσε στην καρδιολιπίνη σε αντίθεση με τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη. Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη είχε λιπαρά οξέα με πάνω από 20 άνθρακες σε ποσοστό 53%, ενώ στην καρδιολιπίνη δεν βρέθηκαν τέτοια λιπαρά οξέα (Masoro et al. 1966).

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Piotrowska και συν. (2000) σε ερυθρό και λευκό γαστροκνήμιο μυ επιμύων ανέφερε ότι στον ερυθρό μυ η

φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 30%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 7% και η καρδιολιπίνη το 8% των ολικών φωσφολιπιδίων. Στον λευκό γαστροκνήμιο τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 27, 9 και 4%.

Σύμφωνα με τους Górski και συν. (1999) η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελεί το 29%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 4% και η καρδιολιπίνη το 8% των συνολικών φωσφολιπιδίων στον ερυθρό γαστροκνήμιο μυ επιμύων. Τα αντίστοιχα ποσοστά στον λευκό γαστροκνήμιο ήταν 25, 5 και 4%.

Οι Blackard και συν. (1997) προσδιόρισαν την ποσοστιαία κατανομή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης σε δύο σκελετικούς μύες με διαφορετικά φυσιολογικά χαρακτηριστικά (τον υποκνημίδιο, τύπου I, και το μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους, τύπου II) σε επίμυες και δε βρήκαν διαφορές μεταξύ τους. Όσον αφορά τη σύσταση των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης στον υποκνημίδιο ήταν 4% 16:0, 23% 18:0, 4% 18:1 $\omega$ 9, 5% 18:2 $\omega$ 6, 11% 20:4 $\omega$ 6, 0,1% εικοσιπενταενοϊκό (20:5 $\omega$ 3), 4% 22:5 $\omega$ 3 και 25% 22:6 $\omega$ 3. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το μακρό εκτείνοντα τους δακτύλους ήταν 4, 22, 4, 6, 8, 0,8, 4 και 27%. Οι μόνες στατιστικά σημαντικές διαφορές στο προφίλ των λιπαρών οξέων μεταξύ των δύο μυών εμφανίστηκαν στα 16:0, 18:2 $\omega$ 6 και 20:4 $\omega$ 6, και μπορούν να χαρακτηριστούν γενικά μικρές.

Σύμφωνα με τους Okano και συν. (1980) η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελεί το 21%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 7% και η καρδιολιπίνη το 2% των συνολικών φωσφολιπιδίων στο μηριαίο μυ επιμύων. Τα αντίστοιχα ποσοστά στον υποκνημίδιο ήταν 29%, 7% και 5%.

Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Therriault και συν. (1973) σε σκελετικό μυ σκύλων βρήκε ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 26%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 5% και η καρδιολιπίνη το 6% των συνολικών φωσφολιπιδίων.

Οι Fiehn και συν. (1971) βρήκαν ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελεί το δεύτερο αφθονότερο φωσφολιπίδιο (μετά την φωσφατιδυλοχολίνη) στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και στις μεμβράνες του σαρκοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων του σκελετικού μύος επιμύων.

Τέλος, οι Dohm και συν. (1975) απομόνωσαν μιτοχόνδρια από γαστροκνήμιο μυ επιμύων και βρήκαν ότι η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη αποτελούσε το 30%, η φωσφατιδυλινοσιτόλη το 5% και η καρδιολιπίνη το 17% των ολικών φωσφολιπιδίων.

## **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 παρούσας έρευνας ήταν ο χαρακτηρισμός της σύστασης σε λιπαρά οξέα της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μυός επίμυων.

## **ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

Σε συνδυασμό με μια άλλη μεταπτυχιακή διατριβή που μελετά τα υπόλοιπα φωσφολιπίδια του γαστροκνημίου μυός (μεταπτυχιακή διατριβή Χρύσας Αργυρού), η παρούσα έρευνα παρέχει 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 πειραματοζώων μετά από άσκηση με σκοπό τη διαλεύκανση των επιδράσεων 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». 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  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  ομογενοποιημένου για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και της δραστικότητας της οξειδάσης του κυτοχρώματος *c* (cytochrome *c* oxidase). 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 πορήνων*

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  $4^{\circ}\text{C}$ . 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 στα  $10,000 \times g$  για 10 min στους  $4^\circ\text{C}$ . 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  $\mu\text{L}$  διαλύματος ομογενοποίησης στους  $4^\circ\text{C}$  και μεταφέραμε το μιτοχονδριακό παρασκεύασμα σε φαρδύ γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα σε τελικό όγκο 500  $\mu\text{L}$ . Αφαιρέσαμε 80  $\mu\text{L}$  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 1,44 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  $\text{N}_2$  με ελαφριά θέρμανση ( $40^\circ\text{C}$ ).

### *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  $\mu\text{L}$  χλωροφόρμιου –μεθανόλης 2:1 (v/v) και ενσταλλάξαμε 10  $\mu\text{L}$  στη γωνία (2,5 cm από κάθε πλευρά) μιας πλάκας από σίλικα της εταιρείας Sigma (St. Louis, 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  $90^\circ$  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 (Sigma) 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 (δεν εντοπίσαμε φωσφατιδικό οξύ) σε τρεις γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους είχαμε προσθέσει 5  $\mu\text{L}$  διαλύματος δεκαπενταενοϊκού οξέος σε χλωροφόρμιο συγκέντρωσης 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ως ουσία αναφοράς. Προσθέσαμε 0,5 mL μεθανολικού διαλύματος μεθοξειδίου του νατρίου (Sigma) και επώασαμε στους 50° για 10 min. Κατόπιν, προσθέσαμε 0,5 mL μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βορίου (Fluka, Buchs, Ελβετία) και επαναλάβαμε 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 N<sub>2</sub> 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  $\mu\text{L}$  εξανίου αντίστοιχα και εισάγαμε 1, 3 και 3  $\mu\text{L}$  αντίστοιχα με μικροσύρυγγα στην αρχή της στήλης.

Κατά την έξοδο 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 της ουσίας αναφοράς.

Στη συνέχεια η μάζα κάθε μεθυλεστέρα μετατρεπόταν σε  $\mu\text{mol}$  διαιρώντας με το MB του. Γνωρίζοντας ότι 1 mol μεθυλεστέρα αντιστοιχεί σε 1 mol λιπαρού οξέος, η παραπάνω ποσότητα μετατρεπόταν σε  $\mu\text{mol}$  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 φωσφατιδυλαιθανο-λαμίνη, 2 για τη φωσφατιδυλινοσιτόλη και 4 για την καρδιολιπίνη). Η συγκέντρωση μετατράπηκε στη συνέχεια σε εκατοστιαίο ποσοστό επί του συνόλου των φωσφολιπιδίων σε συνδυασμό με τα δεδομένα από τη μεταπτυχιακή διατριβή της Χρύσας Αργυρού.

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 μεθοξιδίου του νατρίου και μεθανολικού διαλύματος τριφθοριούχου βορίου, όπως περιγράφηκε παραπάνω, σε λίγα mg της τροφής των πειραματοζών. 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 Shapiro- και βρήκαμε ότι δεν διέφερε σημαντικά από την κανονική. Για να συγκρίνουμε το ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος μεταξύ των οκτώ λιπιδίων,

πραγματοποιήσαμε ανάλυση διακύμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.

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

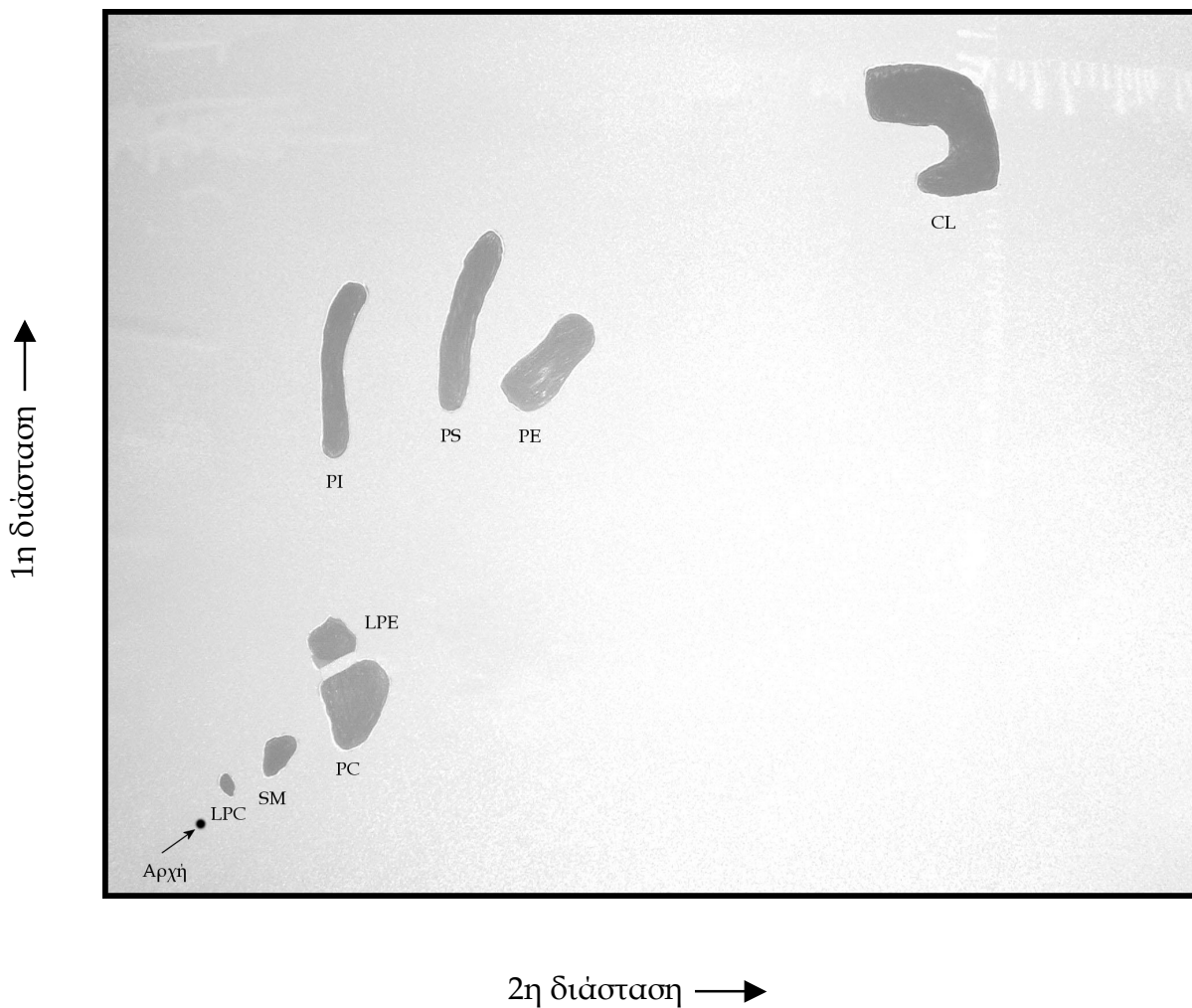
Δεκατέσσερα λιπαρά οξέα ανιχνεύθηκαν σε σημαντικές ποσότητες με την αέρια χρωματογραφία: μυριστικό (14:0), παλμιτικό (16:0), παλμιτελαϊκό (16:1 $\omega$ 7), στεατικό (18:0), ελαϊκό (18:1 $\omega$ 9), *cis*-βαξενικό (18:1 $\omega$ 7), λινελαϊκό (18:2 $\omega$ 6),  $\gamma$ -λινελανικό (18:3 $\omega$ 6), *n*-λινελανικό (18:3 $\omega$ 3), γονδοϊκό (20:1 $\omega$ 9), διομο- $\gamma$ -λινελανικό (20:3 $\omega$ 6), αραχιδονικό (20:4 $\omega$ 6), εικοσιδιπενταενοϊκό (22:5 $\omega$ 3) και εικοσιδιεξαενοϊκό (22:6 $\omega$ 3). 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 18:2 $\omega$ 6, 18:1 $\omega$ 9 και 16:0, που συγκέντρωναν το 86% του συνόλου.

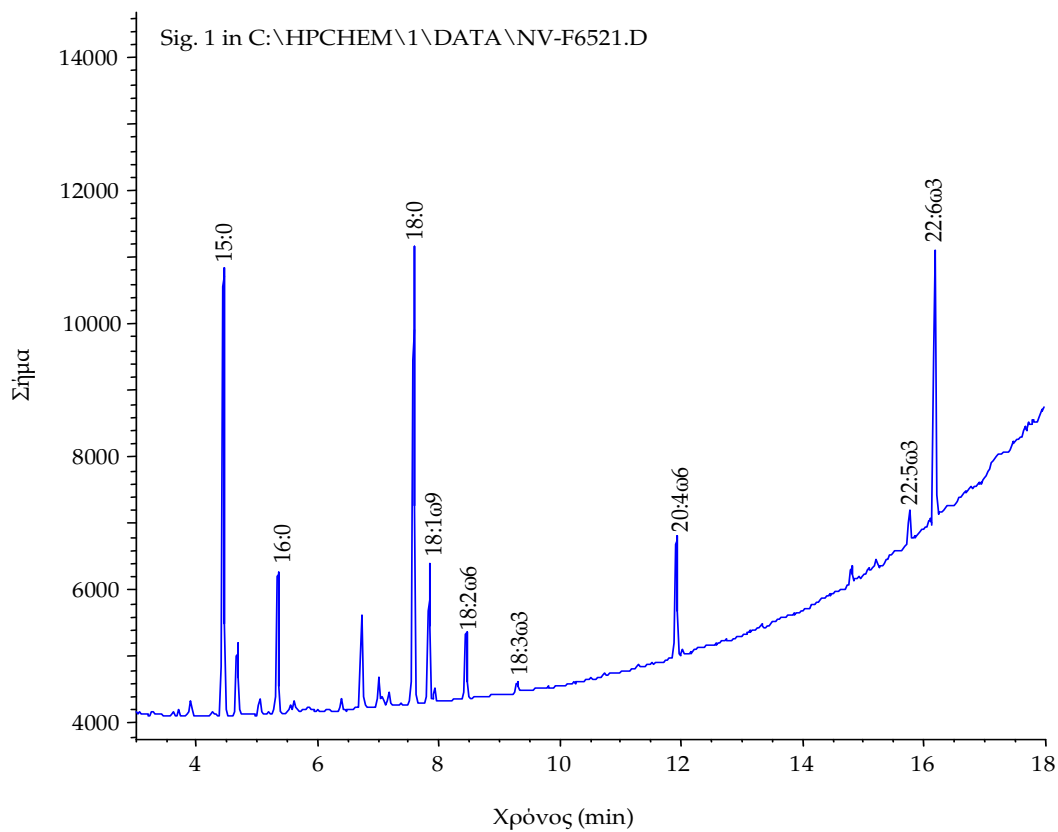
### *Αξιολόγηση της τεχνικής απομόνωσης των μιτοχονδρίων*

Ο εμπλουτισμός του μιτοχονδριακού παρασκευάσματος σε CCO (δηλαδή σε μιτοχόνδρια) ως το πηλίκο της ειδικής δραστικότητας της CCO στα μιτοχόνδρια προς την ειδική δραστικότητά 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 μύος επιμύων.

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

| Λιπαρό οξύ | %     |
|------------|-------|
| 14:0       | 0,9   |
| 16:0       | 18,1  |
| 16:1ω7     | 0,6   |
| 18:0       | 4,4   |
| 18:1ω9     | 31,5  |
| 18:1ω7     | 1,7   |
| 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 φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Η ανάλυση διακόμανσης με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις έδειξε ότι υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των μεμονωμένων

**Πίνακας 2.** Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή των επιμέρους λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης στα μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μύος επίμυος (μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση)

| Λιπαρό οξύ | Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη | Φωσφατιδυλινοσιτόλη | Καρδιολιπίνη      |
|------------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 14:0       | 0,45 ± 0,14 β, γ       | 1,51 ± 0,52 α, γ    | 3,18 ± 1,54 α, β  |
| 16:0       | 11,22 ± 2,39 β, γ      | 17,79 ± 5,77 α, γ   | 29,26 ± 4,50 α, β |
| 16:1ω7     | 1,16 ± 0,74 γ          | 1,69 ± 0,59 γ       | 2,52 ± 0,85 α, β  |
| 18:0       | 32,38 ± 4,00 β, γ      | 49,73 ± 13,89 α, γ  | 11,55 ± 2,26 α, β |
| 18:1ω9     | 10,42 ± 3,64 γ         | 7,73 ± 3,76 γ       | 23,60 ± 2,65 α, β |
| 18:1ω7     | 3,43 ± 3,37            | 0,73 ± 0,34 γ       | 3,31 ± 0,70 β     |
| 18:2ω6     | 6,29 ± 0,85 β, γ       | 3,72 ± 2,10 α, γ    | 22,41 ± 4,90 α, β |
| 18:3ω6     | 0,28 ± 0,08 β          | 0,13 ± 0,13 α, γ    | 0,26 ± 0,09 β     |
| 18:3ω3     | 1,19 ± 0,82            | 0,70 ± 0,30         | 0,96 ± 0,30       |
| 20:1ω9     | 0,23 ± 0,13            | 0,08 ± 0,14 γ       | 0,34 ± 0,09 β     |
| 20:3ω6     | 1,16 ± 2,97            | 0,55 ± 0,48 γ       | 0,11 ± 0,11 β     |
| 20:4ω6     | 8,04 ± 2,85 γ          | 8,22 ± 5,39 γ       | 1,30 ± 0,42 α, β  |
| 22:5ω3     | 2,77 ± 0,61 β, γ       | 1,46 ± 1,39 α       | 0,46 ± 0,22 α     |
| 22:6ω3     | 21,00 ± 3,54 β, γ      | 5,96 ± 6,30 α       | 0,74 ± 0,29 α     |
| Σύνολο     | 100,00                 | 100,00              | 100,00            |

<sup>α</sup> Σημαντικά διαφορετικό από τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη

<sup>β</sup> Σημαντικά διαφορετικό από τη φωσφατιδυλινοσιτόλη

<sup>γ</sup> Σημαντικά διαφορετικό από την καρδιολιπίνη

λιπαρών οξέων εκτός του 18:3 $\omega$ 3 και στα τρία φωσφολιπίδια. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών συγκρίσεων.

Το **14:0** στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη ήταν σημαντικά χαμηλότερο από ό,τι στην φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη ( $P < 0,001$  και  $P = 0,001$  αντίστοιχα). Επίσης ήταν σημαντικά χαμηλότερο στη φωσφατιδυλινοσιτόλη από ό,τι στην καρδιολιπίνη ( $P = 0,01$ ).

Σημαντικά χαμηλότερο ήταν και το **16:0** στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στην φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,027$  και  $P < 0,001$  αντίστοιχα). Επίσης ήταν σημαντικά χαμηλότερο στη φωσφατιδυλινοσιτόλη από ό,τι στην καρδιολιπίνη ( $P = 0,002$ ).

Το **16:1 $\omega$ 7** ήταν σημαντικά υψηλότερο στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P = 0,01$  και  $P = 0,04$  αντίστοιχα).

Το **18:0** ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλινοσιτόλη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,003$  και  $P = 0,001$  αντίστοιχα). Σημαντικά υψηλότερο ήταν και στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη σε σύγκριση με την καρδιολιπίνη ( $P = 0,001$ ).

Το **18:1 $\omega$ 9** ήταν σημαντικά υψηλότερο στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P < 0,001$ ).

Το **18:1 $\omega$ 7** ήταν σημαντικά υψηλότερο στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P < 0,001$ ).

Το **18:2 $\omega$ 6** ήταν σημαντικά υψηλότερο στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P = 0,001$ ).

Υψηλότερο ήταν και στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P = 0,008$ ).

Το **18:3ω6** ήταν σημαντικά χαμηλότερο στη φωσφατιδυλινοσιτόλη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,006$  και  $P = 0,031$  αντίστοιχα).

Το **18:3ω3** δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών φωσφολιπιδίων.

Το **20:1ω9** ήταν σημαντικά υψηλότερο στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P < 0,001$ ).

Το **20:3ω6** ήταν σημαντικά χαμηλότερο στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P = 0,045$ ).

Το **20:4ω6** ήταν σημαντικά χαμηλότερο στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P < 0,001$  και  $P = 0,008$  αντίστοιχα).

Το **22:5ω3** ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,025$  και  $P < 0,001$  αντίστοιχα).

Τέλος, το **22:6ω3** ήταν σημαντικά υψηλότερο στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη ( $P < 0,001$ ).

Για την καλύτερη απεικόνιση και την ευκολότερη σύγκριση της ποσοστιαίας κατανομής των λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης,

της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης παρουσιάζονται τα σχήματα 3, 4 και 5.

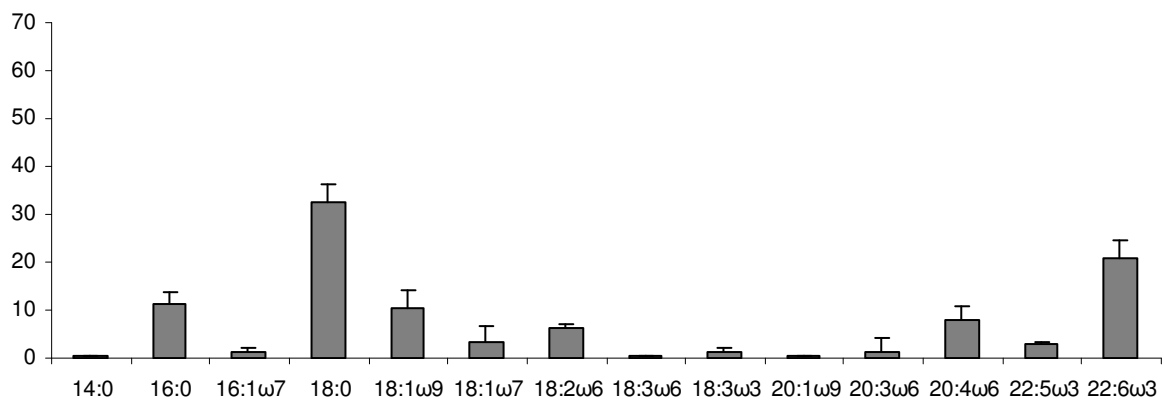
Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ποσοστά των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, των  $\omega 6$  λιπαρών οξέων, των  $\omega 3$  λιπαρών οξέων, ο λόγος  $\omega 6/\omega 3$  λιπαρά οξέα, ο λόγος των ακόρεστων προς κορεσμένα λιπαρά 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 τρία φωσφολιπίδια. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των ζευγαρωτών συγκρίσεων.

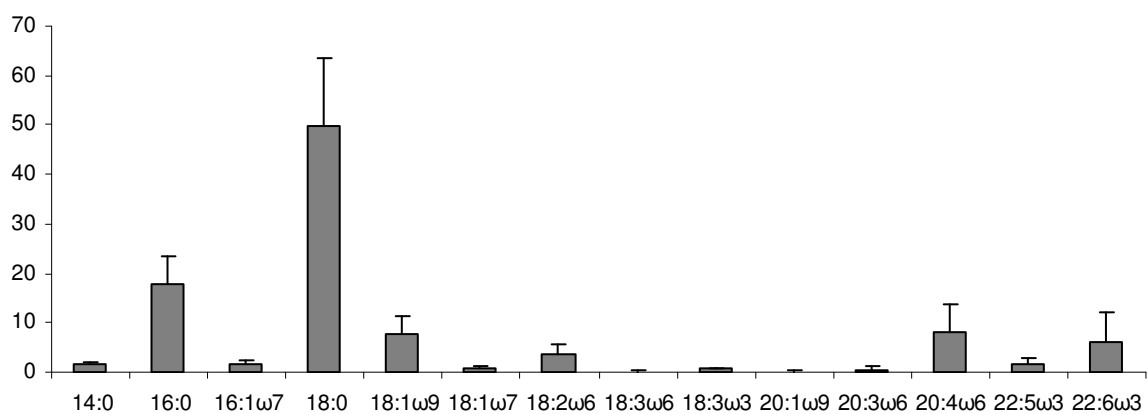
Τα **κορεσμένα** λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερα στη φωσφατιδυλινοσιτόλη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,002$  και  $P = 0,001$  αντίστοιχα).

Τα **ακόρεστα** λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερα στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και την καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P = 0,002$  και  $P = 0,001$  αντίστοιχα).

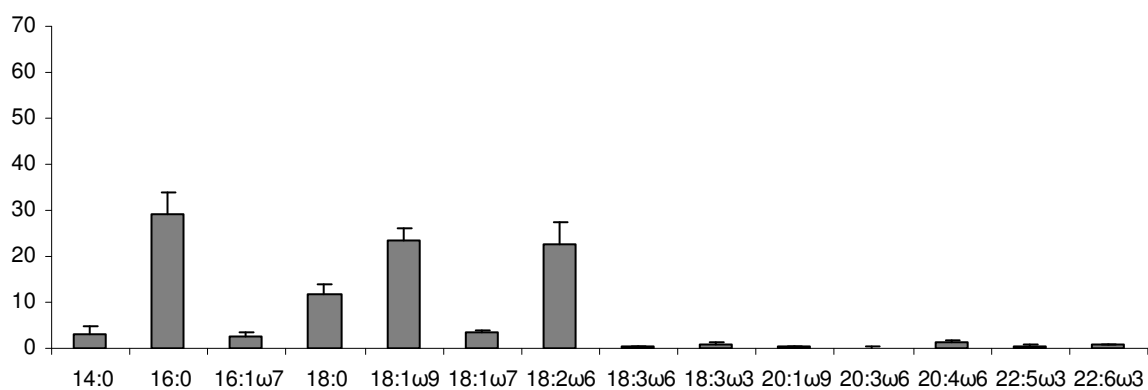
Τα **μονοακόρεστα** λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερα στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη



Σχήμα 3. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης



Σχήμα 4. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της φωσδατιδυλινοσιτόλης



Σχήμα 5. Ποσοστιαία κατανομή λιπαρών οξέων της καρδιολιπίνης

**Πίνακας 3.** Δείκτες του προφίλ λιπαρών οξέων στα τρία φωσφολιπίδια των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μύος επίμυος (μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση)

| Λιπαρό οξύ       | Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη         | Φωσφατιδυλινοσιτόλη           | Καρδιολιπίνη                 |
|------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Κορεσμένα (%)    | 44,05 ± 3,56 <sup>β</sup>      | 69,03 ± 17,19 <sup>α, γ</sup> | 43,99 ± 17,19 <sup>β</sup>   |
| Ακόρεστα (%)     | 55,95 ± 3,54 <sup>β</sup>      | 30,97 ± 17,19 <sup>α, γ</sup> | 56,01 ± 17,19 <sup>β</sup>   |
| Μονοακόρεστα (%) | 15,24 ± 3,65 <sup>β, γ</sup>   | 10,24 ± 3,74 <sup>α, γ</sup>  | 29,78 ± 2,45 <sup>α, β</sup> |
| Πολυακόρεστα (%) | 40,71 ± 4,83 <sup>β, γ</sup>   | 20,73 ± 14,07 <sup>α</sup>    | 26,24 ± 14,07 <sup>α</sup>   |
| ω6 (%)           | 15,76 ± 1,40 <sup>γ</sup>      | 12,61 ± 6,86 <sup>γ</sup>     | 24,07 ± 6,86 <sup>α, β</sup> |
| ω3 (%)           | 24,95 ± 4,01 <sup>β, γ</sup>   | 8,12 ± 7,74 <sup>α</sup>      | 2,16 ± 7,74 <sup>α</sup>     |
| ω6/ω3            | 0,64 ± 0,09 <sup>β, γ</sup>    | 2,35 ± 1,31 <sup>α, γ</sup>   | 11,23 ± 1,31 <sup>α, β</sup> |
| A/K *            | 1,28 ± 0,19 <sup>β</sup>       | 0,56 ± 0,53 <sup>α, γ</sup>   | 1,32 ± 0,53 <sup>β</sup>     |
| ΔΑ *             | 207,65 ± 24,47 <sup>β, γ</sup> | 97,74 ± 69,31 <sup>α</sup>    | 90,52 ± 69,31 <sup>α</sup>   |

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

<sup>α</sup> Σημαντικά διαφορετικό από τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη

<sup>β</sup> Σημαντικά διαφορετικό από τη φωσφατιδυλινοσιτόλη

<sup>γ</sup> Σημαντικά διαφορετικό από την καρδιολιπίνη.



#### Πίνακας 4. Εκατοστιαία γραμμομοριακή κατανομή

φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, φωσφατιδυλινοσιτόλης και καρδιολιπίνης σε μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μύος επίμυος (μέσες τιμές ± τυπική απόκλιση)

| Φωσφολιπίδιο           | %            |
|------------------------|--------------|
| Φωσφατιδυλαιθανολαμίνη | 18,18 ± 2,93 |
| Φωσφατιδυλινοσιτόλη    | 5,12 ± 1,36  |
| Καρδιολιπίνη           | 14,68 ± 5,62 |

φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P < 0,001$ ). Επίσης ήταν σημαντικά υψηλότερα στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P = 0,026$ ).

Τα **πολυακόρεστα** λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερα στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,002$  και  $P < 0,001$  αντίστοιχα).

Τα **ω6** λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερα στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P = 0,002$  και  $P = 0,001$  αντίστοιχα).

Τα **ω3** λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερα στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη ( $P < 0,001$ ).

Ο λόγος **ω6/ω3** λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά υψηλότερος στην καρδιολιπίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και τη φωσφατιδυλινοσιτόλη ( $P < 0,001$ ). Επίσης ήταν σημαντικά υψηλότερος στην

φωσφατιδυλινοσιτόλη σε σύγκριση με την φωσφατιδυλαιθανολαμίνη ( $P = 0,007$ ).

Ο λόγος των ακόρεστων προς τα κορεσμένα λιπαρά οξέα ήταν σημαντικά χαμηλότερος στη φωσφατιδυλινοσιτόλη από ό,τι στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,001$ ).

Τέλος, ο δείκτης ακορεστότητας ήταν σημαντικά υψηλότερος στη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη από ό,τι στη φωσφατιδυλινοσιτόλη και την καρδιολιπίνη ( $P = 0,001$  και  $P < 0,001$  αντίστοιχα).

#### *Φωσφολιπίδια*

Η εκατοστιαία κατανομή της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης, της φωσφατιδυλινοσιτόλης και της καρδιολιπίνης παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Τα τρία αυτά φωσφολιπίδια αντιστοιχούν στο 38 % των ολικών φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων του γαστροκνημίου μύος επιμύων.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα εξέτασε το προφίλ λιπαρών οξέων τριών 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.

Ο εμπλουτισμός του παρασκευάσματός μας σε μιτοχόνδρια κατά 6 περίπου φορές κρίνεται ικανοποιητικός.

Στην παρούσα έρευνα δεν ανιχνεύσαμε φωσφατιδικό οξύ. Το γεγονός αυτό ίσως οφείλεται στη μικρή ποσότητά του. Σε ανασκόπηση του Daum (1985) αναφέρεται ότι το φωσφατιδικό οξύ ίσως να μη συναντάται στα μιτοχόνδρια. Εντοπίσαμε μια μόνο έρευνα που ανίχνευσε φωσφατιδικό οξύ, αλλά σε ολικό ιστό (Cleland et al. 1989).

Η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη ήταν το δεύτερο αφθονότερο φωσφολιπίδιο μετά την φωσφατιδυλοχολίνη (δεδομένο από τη μεταπτυχιακή διατριβή της Χρύσας Αργυρού), αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με ανασκόπηση του Daum (1985) και μελέτη των Fiehn και συν. (1971) σε μιτοχόνδρια σκελετικού μυός επιμών. Το ποσοστό της φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (18%) ήταν χαμηλότερο από αυτό που αναφέρει η βιβλιογραφία για τον ολικό γαστροκνήμιο και που κυμαίνεται από 25 μέχρι 30% (Masoro et al. 1966, Masoro et al. 1967, Piotrowska et al. 2000). Η διαφορά αυτή οφείλεται μάλλον στο μεγαλύτερο ποσοστό της καρδιολιπίνης στα μιτοχόνδρια.

Το ποσοστό της φωσφατιδυλινοσιτόλης (5%) ήταν ίδιο με αυτό που αναφέρεται σε ανασκόπηση του Daum (1985) για τα μιτοχόνδρια του σκελετικού μυός επιμύων και στη μελέτη των Dohm και συν. (1975) σε μιτοχόνδρια γαστροκνημίου μυός επιμύων.

Η καρδιολιπίνη αποτέλεσε το 15% των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων, ποσοστό παρόμοιο με εκείνο της μελέτης των Dohm και συν. (1975), που βρήκαν ότι η καρδιολιπίνη αποτελούσε το 17% των φωσφολιπιδίων των μιτοχονδρίων σε γαστροκνήμιο μυ επιμύων.

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 και της καρδιολιπίνης 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 είχε μεγάλο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 22:6ω3).

- Η φωσφατιδυλινοσιτόλη είχε κυρίως κορεσμένα λιπαρά οξέα (κατά σειρά 18:0 και 16:0).
- Η καρδιολιπίνη είχε μεγάλο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (κυρίως 18:1ω9).

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 δύο 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 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

- 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.
- 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
- Blackard WG, Li J, Clore JN & Rizzo WB (1997). Phospholipid fatty acid composition in type I and type II rat muscle. *Lipids* **32**, 193-198.
- 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 A (1974a). Skeletal muscle lipids. II. Changes in phospholipid composition in man from fetal to middle age. *J Lipid Res* **15**, 103-108.
- Bruce A (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.
- 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.
- Daum G & Vance JE (1997). Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* **32**,103-130.
- Dohm GL, Barakat H, Stephenson P, Pennington SN & Tapscott (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.
- Emoto K & Umeda M (2001). Membrane lipid control of cytokinesis. *Cell Structure and Function* **26**, 659-665.
- Farooqui AA, Horrocks LA & Farooqui T (2000). Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* **106**, 1-29.
- Fiehn W, Peter JB, Mead JF & Gan-Elepano M (1971). Lipids and fatty acids of sarcolemma, sarcoplasmic reticulum and mitochondria from rat skeletal muscle. *J Biol Chem* **25**, 5617-5620.
- Folch J, Lees M & Sloane-Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.

- 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, Oscai LB & Palmer WK (1990). Hepatic lipid metabolism in exercise and training. *Med Sci Sports Exerc* **22**, 213-221.
- Górski J (1992). Muscle triglyceride metabolism during exercise. *Can J Physiol Pharmacol* **70**, 123-131.
- Górski J, Zendzian-Piotrowska M, de Jong YF, Niklinska 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**, 421-4255.
- Haines TH & Dencher NA (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **528**, 35-39.
- 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, Champaign.
- 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). Membrances 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.
- Kalofoutis A, Lekakis J & Miras C (1981). Heart mitochondrial and microsomal phospholipid fluctuation included by chronic exercise in rats. *Int J Biochem* **13**, 195-199.
- Kester M, Schliselfeld LH & Barany M (1984). Minor phospholipids in human muscle. *Molecular Physiology* **5**, 71-84.
- Kogteva GS & Bezuglov VV (1998). Unsaturated fatty acids as endogenous bioregulators. *Biochemistry (Mosc)* **63**, 4-12.
- Kramer JKG, Fellner V, Dugan MER, Sauer FD, Mossoba MD & Yurawecz MP (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* **32**, 1219-1228.
- 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.
- Masoro EJ (1967). Skeletal muscle lipids. III. Analysis of the functioning of skeletal muscle lipids during fasting. *J Biol Chem* **242**, 1111-1114.
- 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.

- McMillin JB & Dowhan W (2002). Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 97-107.
- Okano G, Matsuzaka H & Shimojo T (1980). A comparative study of the lipid composition of white, intermediate, red and heart muscle in rats. *Biochim Biophys Acta* **619**, 167-175.
- Phinney SD (1996). Arachidonic acid maldistribution in obesity. *Lipids* **31**, S271-S274.
- Piotrowska ZM, Górska M, Dworakowski W & Górski J (2000). Effect of triiodothyronine on phospholipids metabolism in skeletal muscles of the rat. *J Physiol Pharmacol* **51**, 103-110.
- Schiller J & Arnold K (2002). Application of high resolution <sup>31</sup>P NMR spectroscopy to the characterization of the phospholipid composition of tissues and body fluids - a methodological review. *Med Sci Monit* **8**, MT205-MT222.
- Therriault DG, Beller GA, Smoake JA & Hartley LH (1973). Intramuscular energy sources in dogs during physical work. *J Lipid Res* **14**, 54-60.
- van der Vusse GJ & Reneman RS (1996). Lipid metabolism in muscle. In *Handbook of Physiology: Regulation and Integration of Multiple Systems*, ed. Rowell LB & Shepherd JT, pp. 1075-1123. Oxford University Press, New York.
- Volker DR (1991). Lipid assembly into cell membranes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, ed. Vance DE & Vance J, pp. 489-523. Elsevier, Amsterdam.
- Wójcik B, Nawrocki A, Chocian G & Górski J (1999). Effect of exercise on fatty acid content in the rat heart. *Biol Sport* **16**, 87-96.

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.