



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ LEKARSKI

**Aleksandra Krystyna Ławniczak**

**Ocena ekspresji sirtuin 1, 3 i 7 w mięśniu sercowym oraz szkieletowym młodych i starych szczurów w warunkach ograniczonej czasowo diety restrykcyjnej oraz cyklu głodzenie- karmienie**

**Promotor:** prof. dr hab. Zbigniew Kmiec

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze i Zakładzie Histologii  
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Badania wykonano w ramach finansowania zadań badawczych realizowanych przez młodych naukowców MN-33, MN-01-0049 oraz badań statutowych ST-12

**Gdańsk, 2014**

**Składam serdeczne podziękowania:**

**Promotorowi, Panu Profesorowi Zbigniewowi Kmieciami,**  
za przekazaną mi wiedzę, wielostronną pomoc i wsparcie.

**Doktor Agacie Wrońskiej** za pomoc merytoryczną i praktyczną w  
wykonywaniu doświadczeń.

**Koleżankom i Kolegom z Katedry Histologii** za życzliwość i miłą,  
niezapomnianą atmosferę pracy naukowo-badawczej.

## SPIS TREŚCI

<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>8</b>
<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. Starzenie się mięśni szkieletowych i serca</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2. Wpływ długotrwałej restrykcji kalorycznej oraz głodzenia na funkcjonowanie mięśnia szkieletowego i serca ssaków w trakcie starzenia</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3. Sirtuiny</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.1 Sirtuina 1</b> .....	<b>28</b>
1.3.1.1 <i>Rola Sirt1 w mięśniu sercowym i szkieletowym</i> .....	28
1.3.1.2 <i>Udział sirtuiny 1 w regulacji metabolizmu energetycznego mięśni</i> .....	29
<b>1.3.2 Sirtuina 3</b> .....	<b>31</b>
1.3.2.1 <i>Rola sirtuiny 3 w kardiomiocytach</i> .....	32
1.3.2.2 <i>Rola sirtuiny 3 w utrzymaniu homeostazy energetycznej komórek mięśniowych</i> ....	33
<b>1.3.3 Sirtuina 7</b> .....	<b>35</b>
<b>2. CELE BADAWCZE</b> .....	<b>38</b>
<b>3. MATERIAŁY</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1. Zwierzęta</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2. Wykorzystane odczynniki, enzymy, bufony i roztwory</b> .....	<b>40</b>
<b>3.3. Materiały podstawowe i aparatura</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4. Wykorzystane programy</b> .....	<b>43</b>
<b>4. METODY</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1. Jednostki badawcze uczestniczące w realizacji projektu</b> .....	<b>44</b>
<b>4.2. Modele doświadczalne</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3. Oznaczanie aktywności palmitoilotransferazy karnitynowej I</b> .....	<b>46</b>
<b>4.4. Przygotowanie preparatów histologicznych</b> .....	<b>47</b>
<b>4.5. Izolacja całkowitego komórkowego RNA</b> .....	<b>47</b>
<b>4.6. Odwrotna transkrypcja</b> .....	<b>48</b>
<b>4.7. Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)</b> .....	<b>49</b>
<b>4.8. Pomiar względnej ilości białek SIRT1, SIRT3 i SIRT7 metodą Western blotting</b> .....	<b>51</b>
<b>4.9. Pomiar stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi szczurów metodą ELISA</b> .....	<b>53</b>
<b>4.10. Oznaczanie poziomu metabolitów w surowicy krwi szczurów</b> .....	<b>53</b>
<b>4.11. Analiza statystyczna wyników</b> .....	<b>53</b>

<b>5. WYNIKI</b> .....	<b>54</b>
<b>5.1. Charakterystyka zwierząt w modelu głodzenie - karmienie</b> .....	<b>54</b>
5.1.1 Zmiany masy ciała zwierząt.....	54
5.1.2 Zmiany stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi młodych i starych szczurów ...	55
5.1.3 Zmiany stężeń wybranych metabolitów w surowicy krwi z obu grup wiekowych....	56
<b>5.2. Charakterystyka zwierząt w modelu diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia <i>ad libitum</i></b> .....	<b>58</b>
5.2.1 Zmiany masy ciała zwierząt.....	58
5.2.2 Zmiany stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi młodych i starych szczurów ...	60
5.2.3 Zmiany stężeń wybranych metabolitów w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych .....	61
<b>5.3. Ekspresja genów i białek sirtuin w sercu oraz mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych</b> .....	<b>63</b>
5.3.1 Ekspresja <i>Sirt1</i> na poziomie mRNA .....	63
5.3.2 Ekspresja sirtuiny 3 na poziomie mRNA i białka .....	65
5.3.3 Ekspresja sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka .....	68
<b>5.4. Ekspresja genów <i>Glut4</i>, <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i>, <i>Ppar-<math>\beta</math></i> w sercu oraz mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych</b> .....	<b>70</b>
5.4.1 Ekspresja <i>Glut4</i> na poziomie mRNA .....	70
5.4.2 Ekspresja <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i> na poziomie mRNA.....	71
5.4.3 Ekspresja <i>Ppar-<math>\beta</math></i> na poziomie mRNA.....	73
<b>5.5. Aktywność i ekspresja palmitoilotransferazy karnitynowej I w sercu i mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych, a następnie karmionych <i>ad libitum</i> przez dwa dni</b> .....	<b>75</b>
5.5.1 Aktywność CPT-I.....	75
5.5.2 Ekspresja <i>Cpt-1</i> na poziomie mRNA.....	77
<b>5.6. Podsumowanie najważniejszych wyników badań w modelu głodzenie – karmienie ....</b>	<b>78</b>
<b>5.7. Ekspresja genów i białek sirtuin w sercu oraz trzech typach mięśni szkieletowych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu <i>ad libitum</i></b> .....	<b>81</b>
5.7.1 Ekspresja <i>Sirt1</i> na poziomie mRNA .....	81
5.7.2 Ekspresja sirtuiny 3 na poziomie mRNA i białka .....	85
5.7.3 Ekspresja sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka .....	90
<b>5.8. Ekspresja genów <i>Glut4</i>, <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i>, <i>Ppar-<math>\beta</math></i> w sercu oraz trzech typach mięśni szkieletowych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu <i>ad libitum</i></b> .....	<b>96</b>
5.8.1 Ekspresja <i>Glut4</i> na poziomie mRNA .....	96
5.8.2 Ekspresja <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i> na poziomie mRNA.....	99

5.8.3 Ekspresja <i>Ppar-β</i> na poziomie mRNA .....	103
<b>5.9. Aktywność i ekspresja palmitoilotransferazy karnitynowej I w sercu oraz trzech typach mięśni szkieletowych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu <i>ad libitum</i> przez dwa dni.....</b>	<b>106</b>
5.9.1 Aktywność CPT-I.....	106
5.9.2 Ekspresja <i>Cpt-I</i> na poziomie mRNA.....	110
<b>5.10. Ocena struktury mięśnia sercowego szczurów poddanych KDR i następującemu karmieniu <i>ad libitum</i> przez 2, 4 i 6 dni .....</b>	<b>113</b>
<b>5.11. Podsumowanie najważniejszych wyników badań w modelu krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia <i>ad libitum</i> .....</b>	<b>117</b>
<b>6. DYSKUSJA .....</b>	<b>121</b>
<b>6.1. Wpływ głodzenia – karmienia na metabolizm energetyczny mięśni młodych i starych szczurów .....</b>	<b>121</b>
6.1.1 Pośrednia ocena insulinowrażliwości mięśni szczurów głodzonych – karmionych	124
6.1.2 Leptynooporność i metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśniach szczurów głodzonych – karmionych .....	126
<b>6.2. Wpływ głodzenia – karmienia na ekspresję sirtuin w mięśniu sercowym oraz szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w kontekście zmian ekspresji genów regulatorów metabolizmu energetycznego .....</b>	<b>130</b>
6.2.1 Ekspresja sirtuiny 1 .....	131
6.2.2 Ekspresja sirtuiny 3 .....	133
6.2.3 Ekspresja sirtuiny 7 .....	137
<b>6.3. Wpływ krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia <i>ad libitum</i> na metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych i serca młodych i starych szczurów .....</b>	<b>139</b>
6.3.1 Pośrednia ocena insulinowrażliwości serca i mięśni szkieletowych szczurów poddanych KDR i przywróceniu karmienia <i>ad libitum</i> .....	141
6.3.2 Leptynooporność i metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśniach szczurów poddanych KDR i następującemu karmieniu <i>ad libitum</i> .....	144
<b>6.4. Wpływ krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia <i>ad libitum</i> na strukturę mięśnia sercowego młodych i starych szczurów .....</b>	<b>148</b>
<b>6.5. Wpływ krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia <i>ad libitum</i> na ekspresję sirtuin w sercu i trzech typach mięśni szkieletowych młodych i starych szczurów w kontekście zmian ekspresji genów regulatorów metabolizmu energetycznego .....</b>	<b>150</b>
6.5.1 Ekspresja sirtuiny 1 .....	150
6.5.2 Ekspresja sirtuiny 3 .....	153
6.5.3 Ekspresja sirtuiny 7 .....	156
<b>7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW i WNIOSKI .....</b>	<b>159</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>163</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW

<b>36B4</b>	kwaśna rybosomalna fosfoproteina P0
<b>AceCS2</b>	syntetaza 2 acetylo-koenzymuA
<b>ACC</b>	karboksylaza acetylo-CoA
<b>AMP</b>	adenozynomonofosforan
<b>AMPK</b>	kinaza białkowa aktywowana przez AMP (ang. <i>AMP-activated protein kinase</i> )
<b>ATP</b>	adenozynotrójfosforan
<b>BMI</b>	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i> )
<b>ChC</b>	cholesterol całkowity
<b>Ch-HDL</b>	cholesterol frakcji HDL
<b>CPT-I</b>	palmitoilotransferaza karnitynowa-I
<b>cDNA</b>	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i> )
<b>CREB</b>	czynnik transkrypcyjny aktywowany w odpowiedzi na cykliczny AMP
<b>DNA</b>	kwasy deoksyrybonukleinowy
<b>dNTP</b>	deoksyrybonukleoid
<b>EDL</b>	mięsień prostownik palców (ang. <i>extensor digitorum longus</i> )
<b>FOXO</b>	czynnik transkrypcyjny O z rodziny <i>forkhead</i>
<b>GAPDH</b>	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
<b>GLUT4</b>	transporter glukozy typu 4
<b>HDL</b>	lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. <i>high density lipoproteins</i> )
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>KDR</b>	krótkotrwała dieta restrykcyjna
<b>LCFA</b>	długołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. <i>Long-Chain Fatty Acids</i> )
<b>MHC</b>	łańcuchy ciężkie miozyny (ang. <i>myosin heavy chain</i> )
<b>mPTP</b>	mitochondrialny megakanał (ang. <i>mitochondrial permeability transition pore</i> )
<b>mRNA</b>	matrycowy/ informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger RNA</i> )
<b>MSM</b>	mięsień szkieletowy mieszany
<b>mtDNA</b>	mitochondrialne DNA
<b>NAD<sup>+</sup></b>	utleniona forma dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego
<b>NADH</b>	zredukowana formadwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego
<b>NAM</b>	nikotynamid
<b>NAMPT</b>	fosforybozylotransferaza nikotynoamidowa NAM

<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	koaktywator-1 alfa receptora gamma aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator-1<math>\alpha</math></i> )
<b>PTP-1B</b>	białkowa fosfataza tyrozynowa (ang. <i>protein tyrosine phosphatase 1B</i> )
<b>PPAR-<math>\beta/\delta</math></b>	receptor aktywowany proliferatorami peroksysomówbeta/delta (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta</i> )
<b>RT-qPCR</b>	ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>Real Time-quantitative PCR</i> )
<b>RFT</b>	reaktywne formy tlenu
<b>RPM</b>	obroty na minutę (ang. <i>rounds per minute</i> )
<b>SIRT</b>	sirtuina (białko)
<b><i>Sirt</i></b>	sirtuina (gen)
<b>SOL</b>	mięsień płaszczkowaty łydki (ang. <i>soleus muscle</i> )
<b>TG</b>	triacyloglicerole
<b>WAT</b>	biała tkanka tłuszczowa (ang. <i>white adipose tissue</i> )
<b>WKT</b>	wolne kwasy tłuszczowe

## STRESZCZENIE

Obecnie na całym świecie, również i w Polsce, odnotowuje się ciągły wzrost liczby ludzi starszych, czyli po 65 roku życia oraz ludzi z chorobliwą nadwagą. Otyłość u ludzi, także w podeszłym wieku, stała się jedną z głównych przyczyn przedwczesnej śmiertelności na podłożu chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy i innych zaburzeń zespołu metabolicznego (Unger i wsp. 2010). W związku z tym, obecnie trwają intensywnie poszukiwania najskuteczniejszych metod jej leczenia. Dotychczas najlepszym sposobem terapii otyłości u ludzi jest regularny wysiłek fizyczny, właściwa dieta oraz stosowanie krótkotrwałych głodówek lub tzw. diet nisko- lub bardzo niskokalorycznych w celu szybkiej redukcji masy ciała i niwelacji objawów zespołu metabolicznego (Tsai i Wadden 2006; Gugliucci i wsp. 2009). Tymczasem brak jest podstawowych danych dotyczących wpływu krótkotrwałej diety restrykcyjnej, czy głodzenia i ponownego karmienia dietą pełną, na metabolizm mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych u starych osobników. Z tego względu, celem pracy była doświadczalna weryfikacja wpływu wymienionych powyżej technik żywieniowych na mięsień sercowy oraz trzy typy mięśni szkieletowych (mieszany, biały i czerwony), w kontekście zmian ekspresji sirtuin w eksperymencie na szczurach, który mógłby stanowić odpowiednik zmian, jakie zachodzą u ludzi.

Doświadczenia żywieniowe przeprowadzono na młodych - dojrzałych (4-5 miesięcy, n= 118) oraz starych szczurach (23-25 miesięcy, n= 105) rasy Wistar-Han, hodowanych w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarńi Doświadczalnej, w otoczeniu wolnym od swoistych patogenów (*specific pathogen-free*). Szczury z obu grup wiekowych poddano 30-dniowej diecie restrykcyjnej (grupa KDR) z ograniczeniem ilości spożywanej paszy do 60% dziennego spożycia szczurów kontrolnych (grupa K) (karmionych *ad libitum*-bez ograniczeń) lub głodzeniu przez dwie doby (grupa G). Po zakończeniu KDR lub dwudobowym głodzeniu część zwierząt usypiano i pobierano materiał, zaś pozostałym podawano pokarm *ad libitum* przez okres 2, 4 lub 6 dni (*refeeding*, odpowiednio grupy KDR+2/4/6 i R2/4/6). Szczury karmiono standardową wysterylizowaną paszą Labofeed H, która zawierała 52% węglowodanów, 11% tłuszczu oraz 37% białka. Od znieczulonych zwierząt pobierano surowice krwi, serce, mięsień szkieletowy mieszany, wycinany w okolicy m. bocznego uda (MSM), mięsień prostownik palców (glikolityczny mięsień biały, EDL, *m. extensor digitorum longus*) oraz mięsień płaszczkowaty łydki (oksydacyjny



mięsień czerwony, SOL, *m. soleus*). Wszystkie próbki mięśni natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dodatkowo, od losowo wybranego szczura młodego i starego z grup K, KDR, KDR+2/4/6, pobrano koniuszek serca, który utrwalono w formalinie do badań histologicznych. Na przeprowadzenie doświadczeń uzyskano zgodę lokalnej komisji bioetycznej.

W uzyskanym materiale dokonano pomiaru: a) poziomu mRNA sirtuin 1, 3 i 7 oraz genów czynników regulujących metabolizm energetyczny (*Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta/\delta$* ), transportera kwasów tłuszczowych (*Cpt-1*) i transportera glukozy 4 (*Glut4*) w sercu i mięśniach szkieletowych młodych i starych szczurów, metodą RT-qPCR; b) względnego poziomu białka sirtuiny 3 i 7 w sercu i mięśniach szkieletowych szczurów z obu grup wiekowych, metodą Western blotting; c) aktywności palmitoilotransferazy karnitynowej I, CPT-I (EC 2.3.1.21) w pobranych mięśniach, metodą spektrofotometryczną; d) stężeń podstawowych metabolitów w surowicy krwi (glukozy, wolnych kwasów tłuszczowych, triacylgliceroli, cholesterolu, cholesterolu-HDL, mocznika, białka całkowitego, albumin) za pomocą standardowych testów diagnostycznych oraz e) stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych, za pomocą testu ELISA. Ponadto wykonano preparaty histologiczne z koniuszków serca młodych i starych szczurów, które wybarwiono metodą Massona-Goldnera w celu określenia stopnia zwłóknienia serca.

Przeprowadzone badania dostarczyły oryginalnych wyników w części dotyczącej ekspresji sirtuin w sercu i mięśniach szkieletowych oraz ekspresji genów niektórych czynników regulujących metabolizm energetyczny w założonych modelach doświadczalnych.

Pod wpływem starzenia ekspresja genu *Sirt1* wzrasta w sercach i mieszanym mięśni szkieletowym starych szczurów. Wykazano, że manipulacje pokarmowe w odmienny sposób wpływają na ekspresję genu *Sirt1* w mięśniu sercowym i szkieletowym młodych i starych szczurów. U 5-miesięcznych zwierząt głodzenie nie wpływa na ekspresję genu *Sirt1* w sercu, ale obniża ją w ich mięśniu szkieletowym. U dwuletnich szczurów dwudniowe głodzenie obniża ekspresję *Sirt1* w obu badanych mięśniach. Pod wpływem KDR ekspresja genu *Sirt1* obniża się w sercu, rośnie w MSM i nie ulega zmianom w mięśniach SOL i EDL młodych szczurów. W trakcie KDR pomimo podwyższonej ekspresji genu *Sirt1* w sercu oraz mięśniach szkieletowych starych szczurów, poziom mRNA regulatorów metabolizmu energetycznego nie uległ istotnym zmianom w badanych tkankach, być może w wyniku obniżonej aktywności SIRT1. Dodatkowo, uzyskane wyniki sugerują, że zmiany ekspresji genu *Sirt1* w trakcie KDR są

zależne od kompozycji włókien danego mięśnia. Zmiany poziomu mRNA *Sirt1* zdają się być szczególnie widoczne w trakcie manipulacji pokarmowych w mięśniu EDL (z przewagą włókien glikolitycznych) starych szczurów.

Ekspresja *Sirt3* jest mięśniowo-specyficzna i podatna na manipulacje dietetyczne szczurów z obu grup wiekowych. Pod wpływem dwudniowego głodzenia ekspresja genu *Sirt3* wzrosła w sercu młodych, ale nie zmieniła się u starych szczurów. Z kolei w mięśniu szkieletowym poziom mRNA *Sirt3* uległ obniżeniu u szczurów z obu grup wiekowych, choć u dwuletnich zwierząt uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie. W mięśniach szkieletowych szczurów, wiek może mieć wpływ na ekspresję *Sirt3*, jednak w warunkach 48-godzinnego głodzenia ekspresja sirtuiny 3 zmienia się niezależnie od wieku, prawdopodobnie biorąc udział w procesach adaptacyjnych mięśni do warunków głodzenia.

W przeciwieństwie do głodzenia krótkotrwała dieta restrykcyjna podwyższyła ekspresję genu *Sirt3* w sercach młodych i starych szczurów. W mięśniach szkieletowych nie wywołała istotnych zmian w poziomie mRNA *Sirt3* u młodych szczurów. Natomiast u starych zwierząt KDR obniżyła ekspresję *Sirt3* w mięśniu SOL, ale nie zmieniła jej w mięśniach EDL i MSM.

Otrzymane wyniki wskazują, że ekspresja *Sirt7* wydaje się być mięśniowo-specyficzna i podatna na manipulacje żywieniowe. Głodzenie obniża ekspresję genu *Sirt7*, natomiast 30-dniowa dieta restrykcyjna powoduje jej wzrost w mięśniu szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów. Dodatkowo, różna ekspresja *Sirt7* w sercu i w mięśniach szkieletowych może sugerować pełnienie odmiennej roli przez sirtuinę 7 w tych tkankach w mechanizmach adaptacji do braku i dostępności pokarmu.

Stare szczury charakteryzują się hiperleptynemią i leptynoopornością, co może prowadzić do obniżonego transportu kwasów tłuszczowych w ich mięśniach. Wskazują na to zmiany w ekspresji *Cpt-1* oraz aktywności enzymu w mięśniach starych szczurów w odpowiedzi na dwudniowe głodzenie.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że metabolizm energetyczny w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym różni się między szczurami młodymi a starymi. Trudno jest jednak jednoznacznie określić, czy uzyskane w pracy dane są rezultatem procesów starzenia *per se*, czy też efektem innych czynników, takich jak otyłość starych zwierząt, brak ruchliwości lub wszystkich tych procesów jednocześnie.

Obserwacje własne oraz innych badaczy wskazują na to, że KDR może stanowić skuteczną metodę obniżenia masy ciała starych zwierząt i ludzi, bez wystąpienia zjawiska

wzrostu masy ciała często obserwowanego po zaprzestaniu diety opartej o całkowitą głodówkę (tzw. „efekt jo-jo”). Jednak stosowanie KDR u ludzi przez kilka lub nawet kilkanaście miesięcy, szczególnie u osób w podeszłym wieku, powinno być prowadzone pod kontrolą lekarza lub dietetyka, tak aby nie wystąpiły szkodliwe dla zdrowia zaburzenia w przemianie białkowej.

## SUMMARY

Currently, throughout the world (also in Poland) there is a continuous increase in the number of older people (over 65 years of age) and people with morbid obesity. Obesity in humans, including the elderly, has become a major cause of premature mortality as the underlying cause of cardiovascular diseases, diabetes and other metabolic syndrome disorders (Unger i wsp. 2010). Therefore, the most effective methods of anti-obesity treatment are currently intensively investigated. So far, the best means of obesity treatment in humans is regular physical activity, proper diet and implementation of short-term fasting or very low/ low-calorie restriction diets to achieve fast reduction of mass and prevent the appearance of the metabolic syndrome symptoms (Tsai and Wadden 2006; Gugliucci et al. 2009). Meanwhile, there is a lack of basic data on the effects of short-term dietary restriction or starvation and subsequent full-diet refeeding, on myocardial and skeletal muscle metabolism in older individuals. Therefore, the aim of the study was to experimentally test the influence of the indicated nutritional techniques on the myocardium and the three types of skeletal muscle (mixed, white and red), in the context of changes in the expression of sirtuins in rats, which could reflect the changes that occur in humans.

Nutrition experiments were performed on young (4-5-month-old, n= 118) and old (23-26-month-old, n= 105) male Wistar-Han rats housed under specific pathogen free conditions in the Tri-city's Academic Animal Experimental Centre. After the pre-trial period young and old rats were assigned to control (K), short-term dietary restriction (KDR) or fasting (G) groups. Rats from control groups were fed *ad libitum* (without limit) during the whole experiment. Animals from the KDR groups received on a daily basis 60% of the baseline food intake for 30 days. Rats from the G group were fasted for two days. At the end of the dieting/fasting period some animals were sampled while others were refed *ad libitum* for 2, 4 or 6 days. Animals were fed a standard, sterilized chow, which provided 52% of energy intake from carbohydrates, 11% from fat, and 37% from proteins. All

animals had free access to water. Sampled animals were fully anesthetised and euthanized by collecting blood from the heart. Tissue samples of the heart, mixed skeletal muscle collected near *vastus lateralis* muscle (MSM), *soleus* muscle (SOL, red type muscle), *extensor digitorum longus* muscle (EDL, white type muscle) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analyses. Additionally, from a randomly selected young and old rat from K, KDR, KDR+2/4/6 groups, the heart's apex was taken and fixed in neutralized 4% formaldehyde solution to prepare histological slides for evaluation of myocardial fibrous tissue content. All animal experimental procedures had been authorized by the local ethical committee.

In the collected material the following measurements were performed: a) the mRNA levels of *Sirt1*, *Sirt3* and *Sirt7*, and of key metabolic regulators (*Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta/\delta$* , *Cpt-1*, *Glut4*) in the heart and skeletal muscles of rats were measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR); b) the protein expression of SIRT3 and SIRT7 in the heart and skeletal muscles of rats were determined by Western blotting; c) the activity of carnitine palmitoyltransferase I, CPT-I (EC 2.3.1.21) in all studied muscles was evaluated spectrophotometrically; d) measurements of metabolites' concentrations (glucose, free fatty acids, triacylglycerols, total cholesterol, HDL-cholesterol, urea, total protein, albumin) in rat blood serum were performed by commercially available standard diagnostic tests; e) the concentration of insulin and leptin in rat blood serum were measured by ELISA tests according to manufacturer's instructions. Additionally, histological slides from the heart's apex of young and old rats from every diet group were stained by Masson trichrome method to evaluate the area occupied by fibrous tissue.

The study provided original results on the expression of sirtuins in the cardiac and skeletal muscles of young and old rats subjected to both presented nutrition experiments.

During aging the expression of *Sirt1* increases in cardiac and mixed skeletal muscle of old rats. Dietary manipulations differently affect *Sirt1* gene expression in the heart and skeletal muscle of young and old rats. In 5-mo old rats fasting reduces the expression of *Sirt1* in the skeletal muscle, but does not affect its expression in the heart. In old rats two days of fasting reduces the expression of *Sirt1* in both examined muscles.

During the short-term dietary restriction (KDR) *Sirt1* gene expression decreases in the heart, increases in MSM and is not affected in the SOL and EDL muscles of young rats. However, in old rats the mRNA levels of key regulators of energy metabolism were not affected, probably through a decreased SIRT1 activity. In addition, during KDR the expression of *Sirt1* appears to depend on fiber type composition of the skeletal muscle.

During the nutrient manipulation changes in mRNA levels of *Sirt1* seem to be particularly evident in the EDL (glycolytic fibers) muscle of old rats.

*Sirt3* expression is muscle-specific and susceptible to dietary manipulations in rats from both age groups. In the cardiac muscle, during two days of fasting the expression of *Sirt3* increased in young rats, but did not change in the old ones. However, in skeletal muscle, mRNA level of *Sirt3* decreased in both age groups of rats, even if in old rats the result was not statistically significant. In skeletal muscle of rats age can affect the expression of *Sirt3*, however, under the 48-hour fasting *Sirt3* expression varies regardless of age, and probably takes part in the process of muscle adaptation to fasting conditions.

Short-term dietary restriction (in contrast to fasting) stimulates *Sirt3* gene expression in the hearts of young and old rats. In skeletal muscles of young rats the expression of *Sirt3* was not affected by KDR. However, in old rats KDR reduced the expression of *Sirt3* in SOL, but not in EDL and MSM muscles.

The expression of *Sirt7* appears to be muscle-specific and susceptible to nutrition manipulations. Fasting has a negative effect, while 30-day-long dietary restriction exerts a positive effect on *Sirt7* gene expression in mixed skeletal muscle of young and old rats. Additionally, the different expression of *Sirt7* in the cardiac and skeletal muscles of rats may suggest its diverse role in muscle adaptations to the terms of starvation and decreased/regained food availability.

Aging of rats was associated with hyperleptinemia and leptin resistance. This in turn could result in impaired expression of *Cpt-I* gene and CPT-I enzyme activity in the examined muscles in response to two days of fasting, and reduced fatty acids transport in muscles of old rats compared to young animals.

It can be concluded that aging affects energy metabolism in rat's cardiac and skeletal muscles. However, it is difficult to clearly determine whether the results obtained in this study are the consequence of the aging process *per se*, or perhaps other factors, such as obesity of old rats, lack of physical activity or all of these processes together.

## 1. WSTĘP

Do podstawowych funkcji mięśni szkieletowych należy ruch i utrzymanie odpowiedniej postawy ciała oraz ruchy niektórych narządów, takich jak gałki oczne lub język. Ponadto mięśnie są bardzo ważną tkanką pod względem metabolizmu energetycznego. Z jednej strony zużywają dostępne w organizmie węglowodany i kwasy tłuszczowe, a z drugiej mogą dostarczać białka i aminokwasy w wyniku proteolizy zachodzącej podczas głodzenia. Ponadto mięśnie odgrywają kluczową rolę w produkcji ciepła w organizmie (Goldspink 2005).

Mięśnie szkieletowe różnią się pod względem morfologicznym, biochemicznym i czynnościowym. W obrębie pojedynczego mięśnia szkieletowego znajdują się różne rodzaje włókien, które klasyfikowane są ze względu na szybkość skurczu, rodzaj metabolizmu oraz wytrzymałość na zmęczenie (Pette i Staron 2000). Wyróżnia się trzy główne typy włókien:

1. **Typ I** to włókna czerwone, wolnokurczliwe, o metabolizmie tlenowym, bardzo wytrzymałe na zmęczenie. Siła skurczu rozwijana przez ten typ włókien jest mała, a narastanie siły powolne.
2. **Typ IIX (IIB)** to włókna białe, szybko kurczliwe, o metabolizmie glikolitycznym, nieodporne na zmęczenie. Włókna te cechują się najwyższą siłą skurczu i najszybszym jej narastaniem.
3. **Typ IIA** to włókna pośrednie, szybko kurczliwe, o metabolizmie oksydacyjno-glikolitycznym, odporne na zmęczenie. Odznaczają się średnim natężeniem siły i szybkości skurczu.

W poszczególnych mięśniach szkieletowych rodzaj i skład procentowy włókien mięśniowych określonego typu jest zróżnicowany i zależy przede wszystkim od funkcji pełnionej przez dany mięsień w organizmie. Jednym z kryteriów klasyfikacji pojedynczych włókien mięśniowych jest analiza ekspresji różnych typów łańcuchów ciężkich miozyny (ang. *myosin heavy chain*, MHC) (Pette i Staron 2000; Scott i wsp. 2001). Izoformy MHC mogą być także markerami uszkodzeń mięśni szkieletowych. Wykrywanie w surowicy krwi odpowiednich izoform łańcuchów miozyny, charakterystycznych dla włókien wolno i szybko kurczących się, może dostarczyć dokładniejszych informacji o stopniu uszkodzenia mięśni szkieletowych niż ultrasonografia lub rezonans magnetyczny (Guerrero i wsp. 2008).

Inną metodą analizy włókien mięśniowych może być także oznaczanie aktywności mięśniowej ATPazy w poszczególnych typach mięśni. Za pomocą tej metody przeanalizowano procentowy udział włókien typu I i II w mięśniu płaszczkowatym łydki oraz mięśniu prostowniku palców młodych szczurów rasy Wistar (Soukup i wsp. 2002). Wyniki uzyskane przez Soukup i wsp. (2002) potwierdzono także analizą ekspresji białek MHC metodą Western blotting (Tab. 1).

Tab. 1. Udział poszczególnych włókien mięśniowych w wybranych typach mięśni szkieletowych młodych (do 7 miesięcy) szczurów rasy Wistar (w %) (Soukup i wsp. 2002).

Mięsień szkieletowy	Typ I	Typ IIA	Typ IIB
SOL (ang. <i>soleus muscle</i> , m. płaszczkowaty łydki)	93,5 ± 3,7%	6,7 ± 3,9%	-
EDL(ang. <i>extensor digitorum longus</i> , m. prostownik palców)	5,7 ± 2,5%	36,9 ± 20%	56,9 ± 21%

Serce jest silnie umięśnionym narządem, znajdującym się w klatce piersiowej, w worku osierdziowym, którego główną funkcją jest pompowanie krwi do naczyń krwionośnych, odpowiedzialnych za dystrybucję krwi w krążeniu układowym. Tkanka mięśnia sercowego zbudowana jest z wielu warstw kardiomiocytów, ściśle ze sobą powiązanych za pomocą anastomoz, zwanych wstawkami. Dzięki nim pobudzenie skurczowe serca z łatwością rozprzestrzenia się z jednych miocytów serca na drugie. Dodatkowym elementem tkanki jest istota międzykomórkowa, w skład której wchodzi tkanka łączna właściwa i blaszki podstawne otaczające poszczególne komórki. Główną część kardiomiocytów stanowi aparat kurczliwy, zorganizowany w sarkomery, dzięki któremu mięsień sercowy wykazuje poprzeczne prążkowanie (Konturek i Pawlik 2007).

Zaopatrzenie mięśnia sercowego w tlen i składniki odżywcze oraz usuwanie końcowych produktów przemiany materii odbywa się za pośrednictwem krążenia wieńcowego. Serce działa w układzie cyklicznym, obejmującym naprzemienne fazy skurczu i rozkurczu przedsionków i komór. Bezpośrednim źródłem energii skurczowej mięśnia sercowego jest fosforylacja oksydacyjna, zachodząca w licznych mitochondriach obecnych w kardiomiocytach, dostarczająca wysokoenergetycznego produktu w postaci adenozynotrójfosforanu (ATP). Zaburzenia w wytwarzaniu ATP lub w dostawie tlenu, prowadzą do natychmiastowego zaburzenia pracy serca (Konturek i Pawlik 2007).

Mięsień sercowy w spoczynku spala głównie kwasy tłuszczowe, stanowiące ok. 70% jego materiału energetycznego. W czasie popokarmowym, kardiomiocyty zużywają glukozę, mleczany oraz niewielką ilość aminokwasów, dostarczające razem około 30%

całkowitej energii. Większość powstającej energii (85%) zostaje zamieniona w ciepło, natomiast tylko 15% zamieniane jest na pracę mechaniczną serca (Konturek i Pawlik 2007). Proporcje te mogą jednak ulec zmianom w trakcie głodzenia, podczas wysiłku fizycznego, czy w trakcie starzenia (van Bilsen i wsp. 1998).

### 1.1. Starzenie się mięśni szkieletowych i serca

Obecnie na całym świecie, w tym i Polsce, odnotowuje się ciągły wzrost liczebności ludzi starszych, czyli po 65 roku życia. Fakt ten, z jednej strony stanowi dowód dużych osiągnięć medycyny, ale także wyznacza kolejne cele i wyzwania dla współczesnej nauki.

Osoby w podeszłym wieku należą, obok sportowców, do grup wysokiego ryzyka wystąpienia uszkodzeń mięśni szkieletowych. U osób starszych zwiększone ryzyko upadku i złamania kończyn powiązane jest często ze zmianami zachodzącymi w mięśniach w trakcie starzenia się organizmu. Wraz z wiekiem dochodzi do stopniowej utraty masy mięśniowej, czyli *sarkopenii*. Termin ten, wprowadzony przed około 20 laty przez Rosenberga (Rosenberg 1997) wyjściowo określał jedynie zjawisko obniżenia masy mięśni szkieletowych, jednak obecnie obejmuje on także inne procesy towarzyszące temu zjawisku wraz z redukcją siły mięśni (Cruz-Jentoft i wsp. 2010; Lang i wsp. 2010). Jedną z fizjologicznie występujących odmian sarkopenii jest związane z wiekiem obniżenie masy mięśni, które dotyczy ok. 25% osób między 50 a 70 rokiem życia i ok. 40% ludzi w wieku 80 lat i powyżej (Lexell i wsp. 1988; Baumgartner i wsp. 1998; Faulkner i wsp. 2007; Ryall i wsp. 2008).

Występujące z wiekiem obniżenie masy mięśniowej jest związane między innymi ze zmniejszaniem się liczby komórek mięśniowych w wyniku apoptozy (Kovacheva i wsp. 2010). Dirks i Leeuwenburgh jako pierwsi zaobserwowali, że u 24-miesięcznych szczurów wzrasta poziom fragmentacji DNA (marker apoptozy) w komórkach mięśnia brzuchatego łydki w porównaniu do szczurów 6-miesięcznych (Dirks i Leeuwenburgh 2002). U ludzi otrzymano podobne wyniki (Whitman i wsp. 2005; Park i wsp. 2010). Za pomocą metody TUNEL zaobserwowano istotny wzrost fragmentacji DNA w mięśniu brzuchatym łydki osób po 70 roku życia w porównaniu do grupy kontrolnej o średnim wieku 21 lat (Whitman i wsp. 2005).

Istotną przyczyną redukcji masy mięśni w starzeniu jest także zmniejszenie objętości (atrofia) pojedynczych włókien mięśniowych (Deschenes 2004; Faulkner i wsp.



2007; Altun i wsp. 2010). W badaniach longitudinalnych przeprowadzonych przez okres 12 lat (wyjściowy wiek mężczyzn wynosił 65 lat), wykazano za pomocą tomografii komputerowej, że zmniejszenie powierzchni przekroju poprzecznego mięśnia czworogłowego uda oraz mięśni zginaczy kolana i łokcia, może wynosić od 1% do 1,4% rocznie (Frontera i wsp. 2000).

Uważa się, że z wiekiem dochodzi do utraty obu głównych typów włókien mięśniowych, czyli I i II, przy czym do około 70 roku życia notuje się większy ubytek włókien typu II (Balagopal i wsp. 2001; Short i wsp. 2005). Po 80 roku życia zmniejsza się również udział włókien typu I. Prowadzi to do powstania nowych proporcji udziału obu typów włókien w poszczególnych mięśniach, co obserwuje się u ludzi w okresie później starości, to jest po 85 roku życia (Andersen 2003a; Narici i Maffulli 2010).

W trakcie starzenia u ludzi dochodzi również do zmian w strukturze i funkcjonowaniu mięśnia sercowego, co w konsekwencji stanowi główny czynnik ryzyka wystąpienia szeroko pojętej niewydolności serca (Lakatta i Sollott 2002). Zmiany te obejmują między innymi obniżenie transkrypcji genu SERCA2 (ang. *Sarcoplasmic reticulum calcium ATP-ase*), kodującego pompę jonową  $Ca^{2+}$ -ATPaza, zlokalizowaną w błonie siateczki śródplazmatycznej i odpowiedzialną za prawidłowy rozkurcz i repolaryzację miocytów dzięki aktywnemu transportowi wapnia z sarkoplazmy z powrotem do zbiorników siateczki śródplazmatycznej (Lakatt i Sollott 2002). Wszelkie nieprawidłowości w transporcie jonów wapnia, mogą powodować zaburzenia pracy i rytmu serca (szczególnie fazy rozkurczowej), często obserwowane u ludzi starszych (Karavidas i wsp. 2010). Dodatkowo, oprócz bezpośredniej roli wapnia w mechanizmie skurczu i relaksacji miocytów, jony  $Ca^{2+}$  odgrywają również rolę wewnątrzkomórkowych wtórnych przekaźników (Kieć-Wilk i wsp. 2009). Dzięki tym właściwościom mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów i odgrywać rolę w takich procesach, jak regulacja wzrostu i apoptozy komórek, czy etiopatogeneza przerostu mięśnia serca (Kieć-Wilk i wsp. 2009).

**Hipertrofia** czyli przerost serca, jest jedną z najczęściej obserwowanych zmian w strukturze mięśnia sercowego u ludzi starszych (Karavidas i wsp. 2010). Dotyczy to szczególnie lewej komory, w której rozrost kardiomiocytów zachodzi między innymi wskutek zawału serca, czy podwyższonego ciśnienia skurczowego, często diagnozowanego u osób w podeszłym wieku (Karavidas i wsp. 2010). Ze względu na bardzo ograniczony potencjał regeneracyjny kardiomiocytów, hipertrofia komórek mięśnia sercowego może być także wynikiem adaptacji do zmniejszającej się liczby miocytów

serca w wyniku apoptozy (Anversa i wsp. 1990; Kwak 2013). Zjawisko to obserwowane w miokardium starzejących się ludzi i zwierząt wymusza hipertrofię pozostałych kardiomiocytów oraz stopniowe **włóknienie mięśnia sercowego** (Anversa i wsp. 1990; Annoni i wsp. 1998; Hagen i wsp. 2002; Wanagat i wsp. 2002). Wzrost udziału tkanki łącznej w strukturze serca zachodzi przede wszystkim między włóknami mięśniowymi, ale także wokół naczyń krwionośnych, co zaobserwowano u 19-miesięcznych samców szczura Sprague-Dawley w porównaniu do 2-miesięcznych zwierząt (Annoni i wsp. 1998). Zanotowano także, że hipertrofia oraz zwłóknienie lewej komory serca zachodzi w większym stopniu u samców szczura niż u samic (Forman i wsp. 1997). Konsekwencją zwłóknienia mięśnia sercowego jest stopniowe sztywnienie śródserdca, upośledzenie kurczliwości serca, arytmia oraz dysfunkcja rozkurczowa lewej komory (Boyle i wsp. 2011; Dai i wsp. 2012).

Starzeniu się organizmów towarzyszą także zmiany hormonalne i metaboliczne, prowadzące do zaburzeń homeostazy energetycznej. U osób w podeszłym wieku wyraża się to między innymi zwiększoną akumulacją tkanki tłuszczowej prowadzącą do otyłości oraz zwiększonym ryzykiem wystąpienia objawów zespołu metabolicznego, obejmującego obok otyłości także oporność na insulinę, cukrzycę typu 2, miażdżycę oraz nadciśnienie tętnicze, które potencjalnie mogą prowadzić do niewydolności serca (Kmieć i wsp. 2005; Karavidas i wsp. 2010).

W starzejącym się mięśniu sercowym i szkieletowym zaburzenia metabolizmu energetycznego przejawiają się między innymi zmniejszonym utlenianiem kwasów tłuszczowych i akumulacją triacylogliceroli w komórkach mięśniowych (Kates i wsp. 2003; van der Meer i wsp. 2008; Łukaszuk i Chabowski 2010; Haramizu i wsp. 2011). Na poziomie molekularnym, w kardiomiocytach dochodzi między innymi do uszkodzenia mitochondriów i mitochondrialnego DNA (mtDNA) wskutek stresu oksydacyjnego (Barazzoni i wsp. 2000; Lakatta, Sollott 2002). Z kolei w mięśniach szkieletowych, maleje potencjał oksydacyjny (Conley i wsp. 2000), częściowo wskutek zmniejszenia się liczby mitochondriów, a także z powodu dysfunkcji tych organelli (Chanséaume i Morio 2009; Marzetti i wsp. 2010; Parise i De Lisio 2010). Główną przyczyną tych zmian są uszkodzenia mtDNA i nagromadzenie się jego mutacji, co prowadzi do zakłóceń w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego i zaburzeń w wytwarzaniu ATP (Bua i wsp. 2006; Hiona i Leeuwenburgh 2008). Mutacje mtDNA powstają przede wszystkim w wyniku stresu oksydacyjnego (Rossi i wsp. 2008; Gredilla 2010), wywołanego głównie przez reaktywne formy tlenu (RFT) powstające w trakcie transportu elektronów przez łańcuch

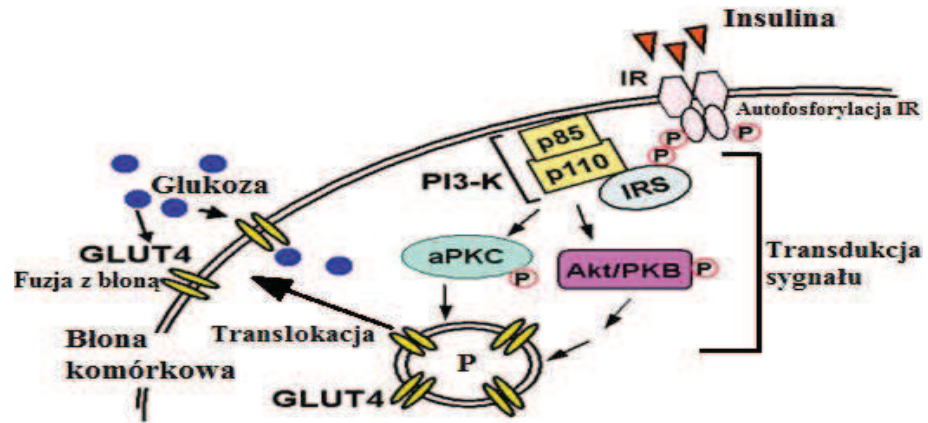
oddechowy i stanowiące uboczne produkty metabolizmu tlenowego. Zaobserwowano, że towarzyszące starzeniu uszkodzenie mitochondriów występuje głównie w mięśniach charakteryzujących się większym udziałem włókien typu II (Fulle i wsp. 2004; Conley i wsp. 2007).

Częstym objawem zaburzeń metabolicznych w starzejących się mięśniach jest także zjawisko insulino- i leptynooporności. **Insulina** jest anabolicznym hormonem, wydzielanym przez komórki  $\beta$  wysp Langerhansa trzustki, w odpowiedzi na podwyższenie stężenia glukozy we krwi. Insulina przyspiesza transport glukozy z krwi do komórek (przede wszystkim do komórek mięśni szkieletowych, wątroby i adipocytów), co powoduje obniżenie stężenia glukozy we krwi, zwiększenie zapasu glikogenu w wątrobie i mięśniach oraz triacylogliceroli w komórkach tłuszczowych (Khan i wsp. 2011). Równocześnie, insulina hamuje endogenne wytwarzanie glukozy oraz lipolizę w adipocytach (Rowland i wsp. 2011).

Mięśnie szkieletowe stanowią ok. 40% masy ciała człowieka (Raffaello i wsp. 2010). Są więc głównym narządem odpowiedzialnym za insulino-zależną utylizację glukozy i utrzymanie homeostazy tego cukru prostego w organizmie (Ijuin i Takenawa 2012). Wychwyty glukozy w komórkach mięśni szkieletowych zachodzi przez **insulino-zależny transporter glukozy-4 (GLUT4)**, który po związaniu insuliny z jej receptorem błonowym przemieszcza się z wnętrza komórki, ulega fuzji z błoną komórkową i transportuje glukozę do wnętrza włókien mięśniowych, obniżając tym samym stężenie cukru we krwi (Ryc. 1) (Ishiki i Klip 2005; Holloszy 2008).

Zjawisko **insulinooporności**, czyli stopniowej redukcji odpowiedzi tkanek i narządów na działanie insuliny (w warunkach jej prawidłowego lub podwyższonego stężenia w surowicy), prowadzi do zmniejszenia transportu dokomórkowego glukozy i jej wykorzystania w mięśniach szkieletowych oraz tkance tłuszczowej. Uważa się, że jednym z czynników wpływających na rozwój insulinooporności u osób starszych jest zmniejszona ilość GLUT4 w szybkich włóknach mięśniowych, za pośrednictwem których insulina stymuluje wychwyty glukozy z krwi do miocytów (Gaster i wsp. 2000; Zhang i wsp. 2010). Dodatkowo zwraca się także uwagę na inne czynniki przyczyniające się do rozwoju insulinooporności, t.j: zmniejszanie się masy mięśniowej oraz mniejsza aktywność fizyczna, które mogą powodować zmniejszenie się liczby i ekspresji receptorów insulinowych; przyrost tkanki tłuszczowej trzewnej, która jest źródłem mediatorów odczynu zapalnego, mogących zaburzać przekazywanie sygnału z receptora insulinowego oraz przyrost tkanki tłuszczowej całkowitej, w której magazynowanie energii wymaga

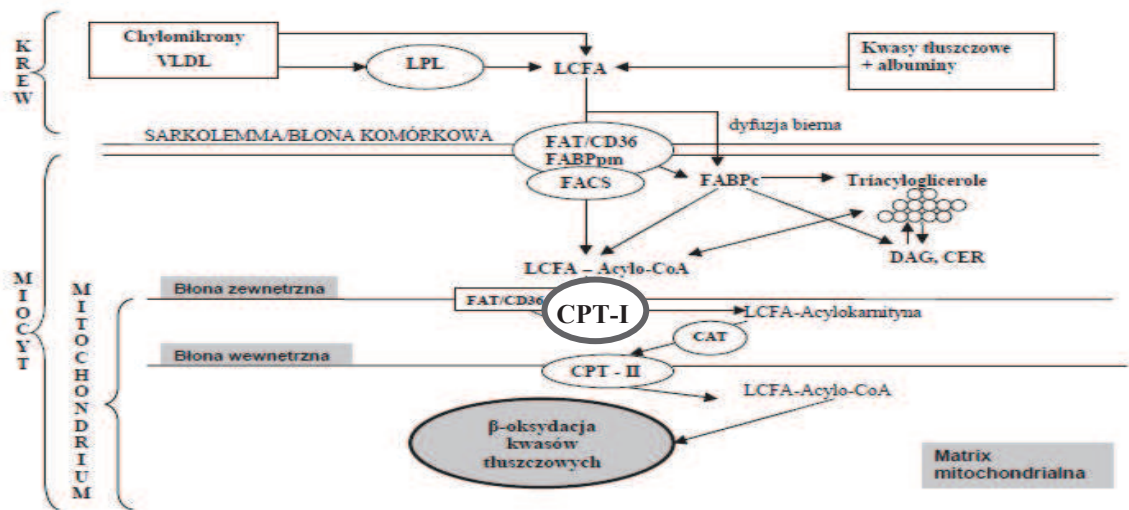
wzmoczonego wydzielania insuliny, co doprowadza po pewnym czasie do kompensacyjnego obniżenia ekspresji receptorów insulinowych (Książek i Witowski 2008).



Ryc. 1. Mechanizm działania mięśniowego, insulino-zależnego transportera glukozy typu 4 (GLUT4). Związanie insuliny prowadzi do zmian konformacyjnych receptora, których wynikiem jest autofosforylacja grup tyrozynowych w podjednostkach  $\beta$  (IR). W wyniku autofosforylacji podjednostka  $\beta$  może fosforylować reszty tyrozynowe innych białek (transdukcja sygnału). Następstwem tego jest translokacja pęcherzyka zawierającego transportery GLUT-4 do błony komórkowej i fuzja transporterów GLUT-4 z błoną komórkową, co prowadzi do wychwytu glukozy do wnętrza miocytów; IR- receptor insuliny; aPKC - atypowa kinaza białkowa C; GLUT-4 - transporter glukozy 4; P- pęcherzyk magazynujący GLUT4; IRS - substrat receptora insulinowego; PI3-K- 3-kinaza fosfatydyloinozytolu; Akt/PKB- kinaza białkowa B; (<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/english/gakka/seibutsu/seibutu1.html>- zmodyfikowany)

Innym ważnym czynnikiem w powstawaniu insulinooporności u osób starszych, pośrednio związanym z wymienionymi powyżej, może być także wewnątrzmięśniowa akumulacja triacylogliceroli (TG) i produktów ich metabolizmu (Kelley i wsp. 1999; Sławik i Vidal-Puig 2006; Kim i wsp. 2009; Abdul-Ghani i DeFronzo 2010). Główną rolę w tym procesie przypisuje się białkowym transporterom kwasów tłuszczowych, FAT/CD36. Wzrost ich ilości w błonie zwiększa dokomórkowy napływ długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, LCFA (ang. *Long-Chain Fatty Acids*) (Bonen i wsp. 2004; Łukaszuk i Chabowski 2010). W momencie, gdy dochodzi do zaburzenia równowagi między nadmiernym dokomórkowym transportem LCFA, a zdolnością mitochondriów do ich utleniania, dochodzi do akumulacji lipidów wewnątrz miocytów (Łukaszuk i Chabowski 2010). W konsekwencji lipidy występujące w nadmiarze ulegają estryfikacji do diacylogliceroli i ceramidów, które mogą zmniejszać wrażliwość włókien mięśniowych na działanie insuliny poprzez zmiany w wewnątrzkomórkowych szlakach transdukcji sygnału (Petersen i wsp. 2003; Łukaszuk i Chabowski 2010; Samuel i wsp.

2010). Schematyczny rysunek przedstawiający metabolizm kwasów tłuszczowych w komórkach mięśni szkieletowych, przedstawiono na Ryc. 2.



Ryc. 2. Metabolizm kwasów tłuszczowych w komórkach mięśni szkieletowych; CAT– acetylotransferaza karnitynowa; CER– ceramid; CPT-I i II– palmitoilolotransferaza karnitynowa I i II; DAG– diacyloglicerol; FABPc– cytoplazmatyczne białka wiążące kwasy tłuszczowe; FABPpm– białka wiążące kwasy tłuszczowe; FACS– syntetaza acylo-CoA; FAT/CD36– translokaza kwasów tłuszczowych; LCFA– długołańcuchowe kwasy tłuszczowe; LDL– lipoproteiny osocza o małej gęstości; VLDL– lipoproteiny osocza o bardzo małej gęstości (zmodyfikowano wg Łukaszk i Chabowski 2010)

Kolejnym hormonem, ważnym w kontekście regulacji metabolizmu energetycznego, jest **leptyna**, wytwarzana przede wszystkim przez dojrzałe komórki białej tkanki tłuszczowej oraz w niewielkich ilościach przez łożysko, mózg, żołądek i gruczoł mlekowy (Jéquier 2002; Gogga i wsp. 2011). Głównymi czynnikami wpływającymi na stężenie leptyny we krwi są masa tkanki tłuszczowej i wielkość adipocytów (Lee i wsp. 2007). Z kolei, jej biosynteza oraz uwalnianie przez komórki tłuszczowe są przede wszystkim regulowane przez insulinę, która indukuje transkrypcję genu *Lep* oraz wpływa na tempo translacji (Lee i wsp. 2007).

Leptyna, uwalniana do krwi dociera z krwią do mózgu, gdzie wiąże się ze swoimi receptorami w neuronach podwzgórza, co prowadzi do obniżenia łaknienia, zmniejszenia spożycia pokarmu, a także do obniżenia masy tkanki tłuszczowej i zwiększenia ilości wydatkowanej energii (Gogga i wsp. 2011; Keung i wsp. 2011). Ostatnio wykazano również, że ekspresja genu kodującego receptor leptyny w mięśniach szkieletowych jest większa niż w pozostałych tkankach obwodowych, co wskazuje, że mięśnie mogą być głównym efektem działania leptyny (Akasaka i wsp. 2010).

W mięśniach szkieletowych leptyna zwiększa utlenianie kwasów tłuszczowych (Atkinson i wsp. 2002; Minokoshi i wsp. 2002), przez co obniża w nich akumulację lipidów i tym samym pomaga utrzymać wrażliwość tkanki na działanie insuliny (Wang i wsp. 2008). Z badań przeprowadzonych na myszach wynika, że leptyna stymuluje utlenianie kwasów tłuszczowych w miocytach poprzez indukcję genów kodujących między innymi palmitoilotransferazę karnitynową-I, CPT-I (EC 2.3.1.21) (Akasaka i wsp. 2009). CPT-I jest kluczowym enzymem regulującym wewnątrzkomórkowy transport długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCFA) w mięśniach szkieletowych i serca (Park i Cook 1997; Eaton i wsp. 2001; Liu i wsp. 2007). CPT-I jest zlokalizowany na zewnętrznej błonie mitochondriów i katalizuje reakcję przenoszenia LCFA do wnętrza mitochondriów, gdzie mogą ulegać utlenianiu w procesie  $\beta$ -oksydacji (Park i Cook 1997). Aktywność enzymu w mięśniach może być modyfikowana przez skład diety (Power i Newsholme 1997; Cameron-Smith i wsp. 2003), restrykcję kaloryczną (Kim i wsp. 2009), głodzenie (Pilegaard i wsp. 2003), starzenie (Kaczor i wsp. 2006) oraz hamowana przez malonylo-CoA, prekursorową cząsteczkę na szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych (Rasmussen i wsp. 2002).

Pod wpływem leptyny w mięśniach dochodzi do wzrostu aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, ang. *AMP-activated protein kinase*), która prowadzi do fosforylacji i obniżenia aktywności karboksylazy acetylo-CoA (ACC, głównego enzymu szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych) i tym samym do obniżenia stężenia malonylo-CoA i odblokowania aktywności CPT-I (Roman i wsp. 2010). W mięśniach szkieletowych leptyna wywołuje również wzrost ekspresji genu kodującego główny regulator biogenezy mitochondriów, PGC-1 $\alpha$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$* ), który indukuje ekspresję genów związanych z fosforylacją oksydacyjną (Roman i wsp. 2010). Ponadto, zaobserwowano, że leptyna zwiększa utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych izolowanych od osób szczupłych, ale nie od otyłych, co wskazuje na występowanie **leptynooporności** tkanek obwodowych u osób z otyłością (Steinberg i wsp. 2002; Gogga i wsp. 2011). Zjawisko stopniowej redukcji odpowiedzi tkanek i narządów na działanie leptyny, przyczyniające się do szkodliwej akumulacji TG w tkankach mięśniowych, zauważono także u starzejących się szczurów rasy Wistar (Fernández-Galaz i wsp. 2002). Do końca nie wiadomo jednak, czy leptynooporność jest związana z wiekiem jako takim, czy z otyłością często obserwowaną u osób starszych, czy z dwoma procesami jednocześnie (Fernández-Galaz i wsp. 2002).

Leptyna może także stymulować utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniu sercowym, choć mechanizm jej działania na razie pozostaje niewyjaśniony (Gogga i wsp. 2011). Wydaje się, że w kardiomiocytach myszy wpływ leptyny na  $\beta$ -oksydację może być modyfikowany przez dietę, ponieważ u tych zwierząt karmionych paszą bogatą w tłuszcze podawanie leptyny do komory serca obniżyło utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniu sercowym, nie wywołując przy tym zmian w ufosforylowaniu AMPK i ACC, ale podnosząc stężenie malonylo-CoA (Keung i wsp. 2011). Natomiast u myszy karmionych paszą wysokowęglowodanową nie zaobserwowano żadnych zmian w metabolizmie lipidów (Gogga i wsp. 2011).

## **CEL 1**

**Dane przedstawione powyżej wskazują na istotną rolę insuliny i leptyny w regulacji metabolizmu energetycznego w tkankach mięśniowych. W niniejszej pracy, w celu ujawnienia możliwych zaburzeń metabolizmu energetycznego w starzejących się mięśniach szkieletowych i serca, 4-miesięczne (młode) oraz 24-miesięczne (stare) szczury poddano dwóm typom manipulacji dietetycznej: dwudniowemu głodzeniu oraz 30-dniowej diecie restrykcyjnej. Zmierzono zmiany średniego stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi młodych i starych szczurów. Dodatkowo, pośrednio zbadano insulino-wrażliwość mięśni wyrażoną zmianami ekspresji genu mięśniowego, insulino-zależnego transportera glukozy- 4 (*Glut4*) oraz przeanalizowano ekspresję i aktywność transportera kwasów tłuszczowych – CPT-I (EC 2.3.1.21). Dotychczas ekspresja mRNA tego enzymu w mięśniu sercowym starych szczurów, poddanych diecie restrykcyjnej nie była jeszcze zbadana.**

### **1.2. Wpływ długotrwałej restrykcji kalorycznej oraz głodzenia na funkcjonowanie mięśnia szkieletowego i serca ssaków w trakcie starzenia**

Już w 1935 roku zaobserwowano, że dieta restrykcyjna, polegająca na ograniczeniu spożycia kalorii o 30-50% opóźnia proces starzenia szczura (McCay i wsp. 1935). Z badań na drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae*) wynika, że restrykcja kaloryczna prowadzi do wydłużenia cyklu replikacyjnego tych organizmów najprawdopodobniej przez zwiększenie dostępności NAD<sup>+</sup> dla białka Sir2 (*Silent information regulator 2*) (Lin i wsp. 2000; Lin i

wsp. 2002). Dodatkowo zaobserwowano, że efekt wydłużenia życia nie występuje u szczepów drożdży z wyłączoną funkcją genu *Sir2* (Howitz i wsp. 2003). Ponadto wykazano, że mutacje genu *Sir2* skracają cykl replikacyjny o 40%, natomiast jego nadekspresja powoduje wydłużenie cyklu replikacyjnego u drożdży (Bitterman i wsp. 2003; Howitz i wsp. 2003). Podobny jak u szczura efekt wydłużenia życia w wyniku stosowania diety restrykcyjnej wykazywano również u nicieni, muszek owocówek, myszy i psów (Goto 2006; Longo 2009). Badania wpływu diety restrykcyjnej na długość życia małp naczelných dostarczyły natomiast niejednoznacznych wyników. Dane opublikowane przez Colmana i wsp. w 2009 dotyczące małp reżusów (*Macaca mulatta*) poddanych przez okres 20 lat diecie ograniczonej do 70% diety pełnej, wskazują na istotne obniżenie śmiertelności i częstości występowania chorób metabolicznych, w tym głównie insulinooporności. Z kolei w roku 2012 Mattison i wsp., stosując ten sam model badawczy potwierdzili korzystny wpływ diety restrykcyjnej na stan zdrowia starych małp, jednak nie zaobserwowali istotnych różnic w przeżywalności między makakami poddanymi restrykcji kalorycznej a małpami grupy kontrolnej. Rozbieżności w otrzymanych wynikach mogą wynikać z różnic genetycznych badanych małp (wynikających z różnego pochodzenia zwierząt), z przebiegu doświadczenia, czy nawet składu stosowanej diety (Mattison i wsp. 2012). Stąd, istotne wydaje się kontynuowanie badań nad wpływem żywienia pełnowartościowego jednak niskokalorycznego, nie tylko w kontekście przedłużania życia, ale może przede wszystkim w celu poprawienia jakości życia osób starszych (Ławniczak i Kmieć 2012).

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w Europie w ciągu ostatnich dwudziestu lat częstość występowania otyłości potroiła się oraz ciągle wzrasta. Otyłość u ludzi, także w podeszłym wieku, stała się jedną z głównych przyczyn przedwczesnej śmiertelności na podłożu chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy i innych zaburzeń zespołu metabolicznego (Unger i wsp. 2010). W związku z tym, obecnie intensywnie poszukuje się najskuteczniejszych metod terapii przeciw chorobliwej nadwadze. Dotychczas najlepszą metodą leczenia otyłości u ludzi jest regularny wysiłek fizyczny, właściwa dieta oraz stosowanie krótkotrwałych głodówek lub tzw. diet nisko- lub bardzo niskokalorycznych w celu szybkiej redukcji masy ciała i niwelacji objawów zespołu metabolicznego (Gugliucci i wsp. 2009; Tsai i Wadden 2006). **Tymczasem nie do końca wiadomo, jaki wpływ ma stosowanie krótkotrwałych głodówek na strukturę i funkcjonowanie mięśni szkieletowych i serca, zwłaszcza u ludzi w podeszłym wieku.**



Dotychczasowe badania na mięśniach szkieletowych szczurów dostarczyły informacji na temat biologicznych efektów długotrwałych diet restrykcyjnych, stosowanych od momentu osiągnięcia dojrzałości płciowej do śmierci zwierząt. Efekty te u szczurów obejmują między innymi mniejszą utratę masy włókien mięśniowych (Phillips i Leeuwenburgh 2005), zapobieganie wewnątrzmięśniowej akumulacji triacylogliceroli (Montori-Grau i wsp. 2009) oraz zwiększenie wrażliwość tkanki na działanie insuliny (Zhu i wsp. 2005). Restrykcja kaloryczna powoduje także wzrost ekspresji i aktywności mięśniowej palmitoilotransferazy karnitynowej I, CPT-I (Kim i wsp. 2009), a także nasilenie lipolizy i akumulacji glikogenu w mięśniach (Sreekumar i wsp. 2002). Ponadto zauważono, że trwająca prawie całe życie dieta restrykcyjna zmniejsza negatywny wpływ stresu oksydacyjnego na komórki mięśniowe. Pobudza ona ekspresję genów antyoksydantów, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa 1 i 2 oraz peroksydaza glutationu (Sreekumar i wsp. 2002), a także hamuje akumulację żelaza w komórkach, zmniejszając tym samym powstawanie reaktywnych form tlenu (Xu i wsp. 2008).

U ludzi otyłych, stosowanie bardzo niskokalorycznej diety (około 600-800 kcal/dobę przez okres 8 tygodni) zmniejszyło insulinooporność oraz poziom nasyconych kwasów tłuszczowych w komórkach mięśnia boczno-uda (Haugaard i wsp. 2007). Dodatkowo, odnotowano zmniejszenie wewnątrzmięśniowej akumulacji triacylogliceroli, choć wynik ten nie był istotny statystycznie (Haugaard i wsp. 2007).

Badania nad wpływem restrykcji kalorycznej na funkcjonowanie mięśnia sercowego dostarczyły niejednoznacznych wyników. U ludzi, Viljanen i wsp. (2009) zaobserwowali, że u 33 otyłych pacjentów poddanych przez 6 tygodni niskokalorycznej diecie, doszło do obniżenia masy mięśnia sercowego oraz zaburzeń pracy serca. Z kolei, Hammer i wsp. (2008) wykazali, że zastosowanie 16-tygodniowej bardzo niskokalorycznej diety u ludzi otyłych (BMI > 35) z cukrzycą typu 2, poprawiło zdolność rozkurczową serca. U szczurów natomiast Okoshi i wsp. (2001), opierając się o doświadczenia na młodych, zdrowych gryzoniach wykazali, że ograniczona podaż kalorii nie hamuje pojawiania się zwłóknień w strukturze serca, ani nie wpływa na jego pracę u pięciomiesięcznych szczurów. Przedstawione dane sugerują, że dieta restrykcyjnej może wpływać na strukturę i funkcję serca, jednak zjawisko to wymaga jeszcze dalszych badań.

Głodzenie, opisujące sytuację wystąpienia nagłego deficytu energetycznego w organizmie, jest również jedną z form leczenia otyłości u ludzi (Johnstone 2007; Varady i wsp. 2009). Głównym mechanizmem adaptacyjnym organizmu do stanu głodu jest przede wszystkim metaboliczna degradacja tkanki tłuszczowej i utlenianie kwasów tłuszczowych

uwalnianych z adipocytów w wyniku wewnątrzkomórkowej lipolizy (Pilegaard i wsp. 2003). W efekcie długotrwałego niedoboru energetycznego zmniejsza się masa innych narządów i tkanek, w tym i masa mięśni szkieletowych (które w wyniku proteolizy białek stają się istotnym źródłem aminokwasów dla wątrobowej glukoneogenezy) i mięśnia serca (Johnstone 2007).

W pierwszych dniach głodu, gdy tempo zmniejszania masy ciała jest największe, w mięśniach szkieletowych dochodzi przede wszystkim do przestawienia metabolizmu energetycznego z utylizacji węglowodanów, na wykorzystanie kwasów tłuszczowych i białka. Zaobserwowano, że u zdrowych ludzi, u których zastosowano 20-72-godzinne głodzenie, nastąpił wzrost lipolizy oraz oksydacji kwasów tłuszczowych (Soeters i wsp. 2009) głównie przez aktywowanie transkrypcji genów związanych z metabolizmem lipidów, w tym genu lipazy lipoproteinowej oraz *Cpt-1* (Pilegaard i wsp. 2003).

W mięśniu sercowym, podobnie jak w mięśniach szkieletowych, w trakcie głodzenia kwasy tłuszczowe są głównym źródłem energii dla pracującego serca (Neely i Morgan 1974; Suzuki i wsp. 2002; Pagano i wsp. 2008; Zhang i wsp. 2010).

## **CEL 2**

**Jak dotąd nie wiadomo, jaki wpływ ma stosowanie krótkotrwałej diety restrykcyjnej (KDR) na parametry metaboliczne oraz cechy strukturalne mięśnia sercowego u osobników młodych („dojrzałych”) oraz w podeszłym wieku? Nie wiadomo także, w jaki sposób KDR mogłaby wpływać na starzejące się mięśnie szkieletowe? Doświadczalna weryfikacja wpływu KDR na mięsień sercowy i szkieletowy u szczurów mogłaby stanowić odpowiednik zmian, jakie zachodzą u ludzi, zwłaszcza w podeszłym wieku. W związku z tym, jednym z celów pracy było określenie wpływu 30-dniowej diety restrykcyjnej na:**

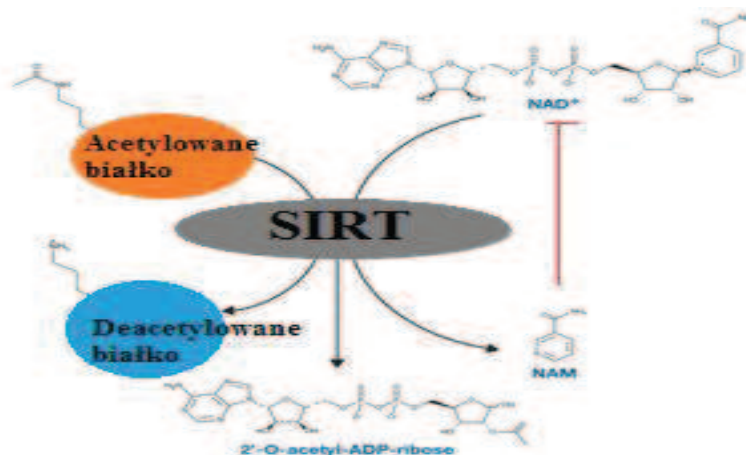
- a) wybrane parametry metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych i serca;**
- b) zmiany w strukturze mięśnia sercowego starych zwierząt w porównaniu z młodymi.**

**Dodatkowo, zmiany badanych parametrów poddano analizie także u zwierząt po przywróceniu karmienia *ad libitum*, co może odzwierciedlać powrót do normalnego żywienia u ludzi po zakończeniu diety.**

**Wszystkie analizowane parametry oceniono także w kontekście zmian ekspresji genów wybranych sirtuin, powiązanych pośrednio z determinacją długości życia organizmów czyli tzw. "enzymów długowieczności".**

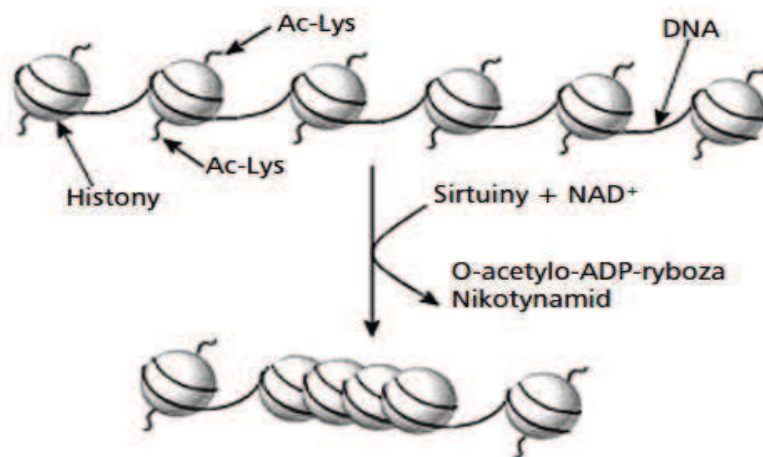
### 1.3. Sirtuiny

U ssaków sirtuiny stanowią rodzinę 7 białek regulatorowych (SIRT1-SIRT7) (Frye 2000), zaangażowanych między innymi w kontrolę cyklu komórkowego, metabolizmu energetycznego, różnicowania się komórek, apoptozy oraz odpowiedzi na stres (Houtkooper i wsp. 2012). Sirtuiny ssaków wykazują homologię do drożdżowego białka Sir2, katalizującego reakcję deacetylacji, czyli odszczepiania reszty kwasu octowego od białkowych substratów (Siedlecka i Bogusławski 2005). Deacetylacji tej towarzyszy hydroliza kofaktora  $\text{NAD}^+$  (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) z utworzeniem nikotynamidu (NAM) i 2-O-acetylo-ADP-rybozy (Ryc. 3) (Imai i wsp. 2000; Siedlecka i Bogusławski 2005). Ponadto, sirtuiny ssaków katalizować mogą również reakcje deacylacji i mono-ADP-rybozylacji (Yuan i Marmorstein 2012). W strukturze sirtuin występują silnie zakonserwowane w toku ewolucji fragmenty sekwencyjne, które są homologiczne u wszystkich białek Sir2 (Siedlecka i Bogusławski 2005). Cecha ta pozwoliła zakwalifikować sirtuiny do czterech głównych klas, oznaczonych I-IV (Frye 2000). Molekularna analiza filogenetyczna wykazała, że pod względem stopnia zgodności sekwencyjnej w komórkach eukariotycznych SIRT1, SIRT2 i SIRT3 należą do klasy I; SIRT4 do klasy II; SIRT5 przyporządkowano do klasy III, natomiast SIRT6 oraz SIRT7 do klasy IV (Frye 2000; Yuan i Marmorstein 2012). SIRT1 lokalizuje się głównie w jądrze komórkowym, aczkolwiek jej położenie może ulegać zmianie z nukleoplazmy do cytozolu pod wpływem różnych sygnałów (Tanno i wsp. 2007). Sirtuina 3 występuje głównie w matrix mitochondrium (Schwer i wsp. 2006; Onyango i wsp. 2002), natomiast sirtuinę 7 zlokalizowano w jąderku (Ford i wsp. 2006).



Ryc. 3. Mechanizm reakcji  $\text{NAD}^+$ -zależnej deacetylacji katalizowanej przez sirtuiny (<https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2193> - zmodyfikowany).

Istotną funkcją sirtuin jest ich wpływ na strukturę chromatyny wskutek deacetylacji białek histonowych (Ryc. 4) (Denu i wsp. 2003). W szczególności, wyciszenie (*silecing*) lub aktywacja transkrypcji niektórych genów może się odbywać z udziałem SIRT1 katalizującej deacetylację reszt lizyny w domenach histonów H3 i H4 (Imai i wsp. 2000). Dodatkowo, ze względu na zależność aktywności sirtuin od dostępności  $\text{NAD}^+$ , sirtuiny uważa się za czujniki stanu energetycznego komórek. W trakcie niskokalorycznej diety dochodzi do zmniejszenia tempa metabolizmu oraz zmiany potencjału oksydoredukcyjnego komórek. Następstwem tego jest zmiana stosunku  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (Anderson i wsp. 2003b), co prowadzi do zwiększenia się puli cząsteczek koenzymu  $\text{NAD}^+$  i aktywacji białek SIRT (Jang i wsp. 2012; Haigis i Guarente 2006).



Ryc. 4. Działanie sirtuin prowadzące do zmiany struktury chromatyny. Ac-Lys —acylowana reszta lizyny białkowego substratu, rozpoznawana przez enzymy SIRT;  $\text{NAD}^+$  — utleniona forma dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (Siedlecka i Bogusławski 2005).

### 1.3.1 Sirtuina 1

#### 1.3.1.1 Rola *Sirt1* w mięśniu sercowym i szkieletowym

Jednym z najlepiej poznanych członków rodziny SIRT jest sirtuina 1. Jej kluczową rolę w prawidłowym rozwoju wykazano u genetycznie zmodyfikowanych myszy. Zaobserwowano, że 90% myszy pozbawionych funkcjonalnej postaci *Sirt1*<sup>-/-</sup> (tzw. *knock-out*, delecja egzonu 4 *Sirt1*) umierało w trakcie rozwoju embrionalnego lub w okresie okołoporodowym, natomiast osobniki, które przeżyły, były mniejsze, rozwijały się powoli oraz wykazywały zaburzenia w morfogenezie oczu i mięśnia sercowego (Cheng i wsp. 2003; Ou i wsp. 2011). Ponadto, myszy *Sirt1*<sup>-/-</sup> ujawniały zaburzenia metaboliczne, niższą aktywność fizyczną oraz nie obserwowano u nich efektu wydłużenia życia pod wpływem diety restrykcyjnej (Boily i wsp. 2008). Z kolei, badania na transgenicznym myszach, w

których wywołano wysoką (12-krotną) nadekspresję *Sirt1* w mięśniu serca ujawniły hipertrofię mięśnia sercowego, zaburzenia w funkcjonowaniu oraz zwiększoną apoptozę kardiomiocytów, czyli zmiany często obserwowane w trakcie starzenia (Alcendor i wsp. 2007). Tymczasem niska i umiarkowana (2,5-7,5-krotna) nadekspresja *Sirt1* redukowała negatywny wpływ stresu oksydacyjnego oraz hamowała apoptozę kardiomiocytów (Alcendor i wsp. 2004; Hsu i wsp. 2008). W związku z tym, zasugerowano, że sirtuina 1 jest niezbędna do prawidłowego rozwoju, regulacji metabolizmu energetycznego, przeciwdziałania zmianom związanym ze starzeniem się oraz wywołania efektu wydłużenia życia na skutek diety restrykcyjnej (Alcendor i wsp. 2007; Boily i wsp. 2008; Ou i wsp. 2011).

#### *1.3.1.2 Udział sirtuiny 1 w regulacji metabolizmu energetycznego mięśni*

Metabolizm komórki podlega regulacji zależnej od jej stanu energetycznego, którego wyrazem jest stosunek zawartości AMP do ATP. Przy wzroście zawartości cząsteczek AMP w stosunku do ATP, stymulacja kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) prowadzi do włączenia szlaków katabolicznych produkujących ATP, przy zahamowaniu szlaków anabolicznych (Dziewulska i wsp. 2010). Cantó i wsp. (2009) zademonstrowali zależność aktywności SIRT1 od AMPK w mięśniach szkieletowych myszy. Autorzy zauważyli, że wzrost aktywności AMPK prowadzi do wzrostu poziomu wolnego  $\text{NAD}^+$  i w efekcie stymuluje aktywność SIRT1, która następnie reguluje transkrypcję genów metabolizmu glukozy i lipidów (Cantó i wsp. 2009). Dodatkowo, Fulco i wsp. (2008) zaproponowali możliwość wspólnego działania kompleksu SIRT1-AMPK z NAMPT (fosforybozylotransferaza nikotynoamidowa NAM, enzym szlaku biosyntezy  $\text{NAD}^+$ ) w warunkach stresowych, takich jak warunki niedoboru energetycznego. W badaniach na hodowlach mioblastów izolowanych od myszy typu dzikiego (niemodyfikowanych genetycznie) wykazali, że obniżenie stężenia glukozy w hodowli powodowało aktywację AMPK i ekspresję genu *Nampt*. Efekt ten był natomiast zahamowany w komórkach pochodzących od heterozygotycznych myszy *Sirt1*<sup>+/-</sup>, nawet po farmakologicznej aktywacji AMPK przez AICAR (Fulco i wsp. 2008). Również pod wpływem wysiłku fizycznego, w mięśniu brzuchatym łydki starych szczurów, wykazano wzrost syntezy  $\text{NAD}^+$  przez NAMPT i w rezultacie wzrost aktywności SIRT1 (Koltai i wsp. 2010).

W wyniku wspólnego działania AMPK i SIRT1 dochodzi do aktywacji cząsteczki PGC-1 $\alpha$  (Cantó i wsp. 2009). Koaktywator PGC-1 $\alpha$  odgrywa kluczową rolę w kontroli metabolizmu energetycznego w mięśniach szkieletowych i mięśniach serca, uczestnicząc między innymi w regulacji biogenezy mitochondriów (Liang i Ward 2006; Lehman i wsp. 2008). Aktywację PGC-1 $\alpha$  przez SIRT1 wykazano w modelach *in vitro* (López-Lluch i wsp. 2006) oraz *in vivo* (Cantó i wsp. 2009; Gerhart-Hines i wsp. 2007). Badania zespołu Gerhart-Hines (2007) pokazały, że deacetylacja PGC-1 $\alpha$  przez SIRT1 jest niezbędna do przestawienia metabolizmu komórkowego na preferencyjne utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniach głodzonych myszy. Podobnie, wzrost deacetylacji PGC-1 $\alpha$  i aktywację transkrypcji genów mitochondrialnych obserwowano także w rezultacie aktywacji SIRT1 przez resweratrol, podczas gdy *knock-down* (obniżona ekspresja) *Sirt1* lub mutacje *Pgc-1 $\alpha$*  w domenach podlegających acetylacji niwelowały te efekty działania resweratrolu (Lagouge i wsp. 2006).

PGC-1 $\alpha$  reguluje metabolizm energetyczny również przez oddziaływanie z receptorami z nadrodziny jądrowych czynników transkrypcyjnych PPAR: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  oraz PPAR- $\gamma$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta/delta and gamma*) (Liang i Ward 2006; Madrazo i Kelly 2008). W momencie połączenia koaktywatora z receptorem PPAR- $\alpha$  dochodzi między innymi do modulacji transkrypcji genów wielu białek uczestniczących m. in. w utlenianiu kwasów tłuszczowych, fosforylacji oksydacyjnej czy glukoneogenezie (Liang i Ward 2006). Przypuszcza się także, że aktywacja PPAR- $\beta/\delta$  może zachodzić w wyniku współdziałania z PGC-1 $\alpha$  (Wang i wsp. 2010), co prowadzi do pobudzenia transkrypcji kluczowych genów utleniania kwasów tłuszczowych (Cheng i wsp. 2004; Wang i wsp. 2010). Na współdziałanie takie wskazują dane uzyskane po specyficznej inaktywacji genu PPAR- $\delta$  w sercu dorosłych myszy (Wang i wsp. 2010). W opisanym modelu autorzy badania obserwowali obniżenie ekspresji PGC-1 $\alpha$  i genów metabolizmu tłuszczów, zmniejszenie zawartości mitochondriów, obniżenie utleniania palmitynianu oraz wzrost uszkodzeń oksydacyjnych (Wang i wsp. 2010). W mięśniach szkieletowych wykazano dodatkowo, że PPAR- $\beta/\delta$  jest w stanie rekompensować niedobór PPAR- $\alpha$  w regulacji metabolizmu tłuszczowego (Muoio i wsp. 2002) oraz przeciwdziała rozwojowi otyłości i hiperlipidemii u myszy (Wang i wsp. 2010). W sercu PPAR- $\beta/\delta$  pobudza transkrypcję palmitoilotransferazy karnitynowej-I (CPT-I) (Cheng i wsp. 2004). CPT-I jest enzymem, dzięki któremu długołańcuchowe kwasy tłuszczowe mogą przenikać przez zewnętrzną błonę mitochondriów i ulegać  $\beta$ -oksydacji w macierzy (Eaton i wsp. 2001). W ten sposób hamowana jest akumulacja

triacylogliceroli w mięśniach szkieletowych, co zapobiega lipotoksyczności, często obserwowanej w starzejącej się tkance mięśniowej (Cheng i wsp. 2004).

Poprzez aktywację PGC-1 $\alpha$  sirtuina 1 wpływa także na ekspresję czynników transkrypcyjnych z rodziny *FoxO* (ang. *forkhead transcription factors O*). Aktywowany przez ćwiczenia fizyczne PGC-1 $\alpha$  w mięśniu *tibialis anterior* myszy obniżał aktywność czynnika FOXO3, a w rezultacie hamował ekspresję tzw. atrofenów (ang. *atrogenes*) odpowiedzialnych za degradację białek mięśniowych, zapobiegając atrofii włókien mięśniowych towarzyszącej procesom starzenia (Sandri i wsp. 2006). W mięśniu sercowym sirtuina 1 może zmniejszać negatywne skutki stresu oksydacyjnego przez modulację ekspresji czynnika FOXO1, który reguluje aktywność niektórych antyoksydantów, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (Hsu i wsp. 2010). Ponadto, SIRT1 pozytywnie wpływa na przeżywalność kardiomiocytów w warunkach hodowli, hamując ekspresję pro-apoptotycznych cząsteczek Bax czy kaspazy-3 (Hsu i wsp. 2008) oraz deacetylację białka p53 (Alcendor i wsp. 2004).

Inną ważną rolę sirtuiny 1 w komórkach mięśniowych jest modulacja szlaku sygnałowania insuliny. W tkankach myszy opornych na insulinę Sun i wsp. (2006) obserwowali obniżenie poziomu SIRT1, a *knock-down* (wyciszenie) lub inhibicja ekspresji SIRT1 powodowały wzrost insulinooporności. Autorzy wykazali, że SIRT1 blokuje ekspresję białkowej fosfatazy tyrozynowej *Ptp-1B* (ang. *protein tyrosine phosphatase 1B*), która hamuje białka szlaku transdukcji sygnału aktywowanego przez związanie insuliny z jej receptorem, wygaszając działanie insuliny (Sun i wsp. 2006). Dzięki temu SIRT1 poprawia wrażliwość tkanek na insulinę i zmniejsza insulinooporność, która często występuje w starzejących się mięśniach szkieletowych (Sun i wsp. 2006). Z drugiej strony, zahamowanie ekspresji *Sirt1* w wątrobie powodowało wzrost insulinooporności całego organizmu u szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą (Erion i wsp. 2009).

### 1.3.2 Sirtuina 3

Dotychczasowe badania na myszach z *knock-out*'em sirtuiny 3 dostarczyły niejednoznacznych wyników. W badaniach Hafner i wsp. (2010) wykazano, że genetycznie modyfikowane myszy pozbawione *Sirt3* w wieku od 2 do 13 miesięcy charakteryzowały się przerostem i włóknieniem mięśnia sercowego oraz zwiększoną śmiertelnością. Z kolei Lombard i wsp. (2007) u myszy *Sirt3*<sup>-/-</sup> nie zaobserwowali żadnych różnic w rozwoju w porównaniu do dzikich (niemodyfikowanych genetycznie)

zwierząt. Podobnie, badania na dwumiesięcznych myszach z mięśniowo-specyficzną dezaktywacją sirtuiny 3 (*Sirt3*<sup>(skm-/-)</sup>) nie wykazały większych zaburzeń metabolicznych oprócz hiperacetylacji niektórych białek mitochondrialnych, nawet w warunkach 8-tygodniowej diety wysokotłuszczowej (Fernandez-Marcos i wsp. 2012).

Wewnątrzkomórkowa lokalizacja sirtuiny 3 jest ciągle tematem debaty wśród naukowców (Pillai i wsp. 2010a). Większość danych wskazuje, że SIRT3 jest białkiem zlokalizowanym głównie w mitochondrium, gdzie obserwuje się jej największą aktywność jako deacetylazy NAD<sup>+</sup>-zależnej, która wzrasta pod wpływem diety restrykcyjnej (Onyango i wsp. 2002; Lombard i wsp. 2007; Hebert i wsp. 2013). Scher i wsp. (2007) zaobserwowali jednak, że w komórkach linii nowotworowej Hela SIRT3 może dodatkowo lokalizować się w jądrze komórkowym. Ponadto, jej położenie może ulegać zmianie z jądra komórkowego do mitochondrium pod wpływem warunków stresowych, takich jak uszkodzenie DNA, promieniowanie ultrafioletowe, czy wysoka nadekspresja *Sirt3* (Scher i wsp. 2007). Z kolei, w mysich kardiomiocytach zaobserwowano, że dłuższa forma SIRT3 występuje w mitochondrium, jądrze i cytoplazmie, natomiast krótsza forma wyłącznie w mitochondrium (Sundaresan i wsp. 2008). Obecność dwóch form SIRT3 wielkości 44 kDa oraz 28 kDa w mitochondriach embrionalnych ludzkich komórek nerki wykazali metodą Western blotting Scher i wsp. (2007). Dalsze ich badania dowiodły, że dłuższa forma SIRT3 posiada dodatkową sekwencję aminokwasów w N-końcowej strukturze białka, określaną jako mitochondrialna sekwencja sygnałowa (Scher i wsp. 2007). Ten dodatkowy fragment sygnałowy w cząsteczce umożliwia transport z jądra nieaktywnej, większej cząsteczki SIRT3 do mitochondrium (Scher i wsp. 2007). Następnie w matrix mitochondrium dochodzi do proteolitycznego odcięcia sekwencji sygnałowej oraz odsłonięcia enzymatycznej domeny w strukturze SIRT3 i jej uaktywnienia (Scher i wsp. 2007). Istotną rolę sirtuiny 3 wykazano w metabolizmie mitochondriów, regulacji przeżywalności komórek, a także powiązano ją ze zjawiskiem starzenia i długowieczności, w tym u człowieka (Bellizzi i wsp. 2005; Guan i Xiong 2011).

#### *1.3.2.1 Rola sirtuiny 3 w kardiomiocytach*

W badaniach Sundaresan i wsp. (2009) wykazano istotną rolę sirtuiny 3 w mięśniu sercowym myszy. W eksperymencie wykorzystano myszy, u których farmakologicznie lub przez przeciążenie wywołane chirurgicznym zmniejszeniem średnicy aorty powodowano hipertrofię mięśnia sercowego. Okazało się, że u tych zwierząt sirtuina 3 blokowała hipertrofię mięśnia sercowego zmniejszając ilość reaktywnych form tlenu przez



pobudzanie Foxo3a-zależnej aktywacji transkrypcji niektórych antyoksydantów, takich jak mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa (MnSOD2), czy katalaza (Sundaresan i wsp. 2009). SIRT3 hamowała także sztucznie indukowaną hipertrofię mięśnia sercowego młodych myszy przez deacetylację kinazy LKB1, która jest bezpośrednim aktywatorem AMPK, przy czym prawdopodobnie w kompleksie z LKB1 i AMPK SIRT3 blokowała czynniki promujące hipertrofię, takie jak kinaza Akt1 i mTOR (Pillai i wsp. 2010b). Z kolei u 16-miesięcznych myszy kardioprotekcyjną aktywność SIRT3 zaobserwowano w regulacji funkcji mitochondriów (Hafner i wsp. 2010). SIRT3 powodowała deacetylację cyklofiliny D, będącej częścią mitochondrialnego megakanalu mPTP (ang. *mitochondrial permeability transition pore*), przez co pomagała utrzymać go w trybie zamkniętym (Hafner i wsp. 2010). mPTP zabezpieczają przed przenikaniem do wnętrza mitochondriów niektórych cząsteczek, które prowadzą do ich pęcznienia i rozerwania z uwolnieniem zawartych w mitochondriach enzymów, w tym czynników indukujących apoptozę (Hafner i wsp. 2010). Obniżenie aktywności SIRT3 może więc prowadzić do nieprawidłowości w funkcjonowaniu mPTP oraz pęcznienia i dysfunkcji mitochondriów skutkującej starzeniem się mięśnia sercowego (Hafner i wsp. 2010).

#### *1.3.2.2 Rola sirtuiny 3 w utrzymaniu homeostazy energetycznej komórek mięśniowych*

Liczne badania wskazują na istotną rolę sirtuiny 3 w regulacji metabolizmu energetycznego komórek. Ahn i wsp. (2008) w komórkach izolowanych od myszy *Sirt3*<sup>-/-</sup> zaobserwowali, że poziom ATP w komórkach mysich embrionalnych fibroblastów oraz w kardiomiocytach był istotnie niższy w porównaniu z myszami kontrolnymi o odpowiednio 30 i 50%. Choć Ahn i wsp. (2008) *in vivo* nie obserwowali poważnych zaburzeń energetycznych u myszy pozbawionych sirtuiny 3, autorzy uznali, że była ona potrzebna do utrzymania odpowiedniego poziomu ATP w komórkach. Dodatkowo, zauważyli możliwą wzajemną regulację między SIRT3 a dehydrogenazą NADH w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów, która dostarczając NAD<sup>+</sup> powoduje aktywację SIRT3 i utrzymanie homeostazy energetycznej w komórkach (Ahn i wsp. 2008). W mieszanym mięśniu szkieletowym i sercu myszy *Sirt3*<sup>-/-</sup>, które poddano 48-godzinnemu głodzeniu, zaobserwowano kolejno ~50% i 30% zmniejszenie utleniania wolnych kwasów tłuszczowych w porównaniu ze zwierzętami szczepu dzikiego (Hirschey i wsp. 2010). Zjawisko to było skorelowane z obniżoną aktywnością dehydrogenazy acylo-CoA oraz

obniżonym poziomem ATP (Hirschey i wsp. 2010). Wyniki te sugerują, że SIRT3 przez deacetylację dehydrogenazy acylo-CoA stymuluje  $\beta$ -oksydację kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach myszy w warunkach głodzenia (Hirschey i wsp. 2010). Potwierdzeniem tej tezy było określenie kolejnego substratu dla SIRT3, czyli syntetazy 2 acetylo-koenzymu A (AceCS2), najliczniej występującej w mitochondriach mięśni szkieletowych i sercu ssaków (Fujino i wsp. 2001; Schwer i wsp. 2006). AceCS2 katalizuje przemianę octanu do acetylo-CoA, który zużywany jest do syntezy kwasów tłuszczowych, niektórych aminokwasów i ciał ketonowych. Acetylacja reszty lizyny w domenie katalitycznej AceCS2 prowadzi do inaktywacji, natomiast deacetylacja przez SIRT3 przywraca aktywność tego enzymu. Podczas głodzenia i restrykcji kalorycznej wzrost stężenia SIRT3 aktywuje AceCS2, co w efekcie zwiększa poziom acetylo-CoA i jego wykorzystanie w procesach pozyskiwania energii, np. w cyklu kwasów trikarboksylowych (Hallows i wsp. 2006; Shimazu i wsp. 2010).

Według badań Palacios i wsp. (2009) sirtuina 3 ulega wyższej ekspresji w tlenowych włóknach typu I (mięśniu płaszczkowatym łydki, *soleus*) niż w szybkokurczliwych włóknach typu II (mięśniu prostownika palców, *extensor digitorum longus*). Ponadto autorzy zaobserwowali, że ekspresja *Sirt3* w mysich mięśniach szkieletowych ulegała dynamicznym zmianom pod wpływem manipulacji pokarmowych oraz aktywności fizycznej (Palacios i wsp. 2009). Karmienie zwierząt przez okres 8 tygodni dietą wysokotłuszczową spowodowało obniżenie ekspresji *Sirt3* w mięśniach myszy, z kolei 12-miesięczna dieta restrykcyjna, 24-godzinne głodzenie oraz ćwiczenia stymulowały jej wzrost (Palacios i wsp. 2009). Dodatkowo okazało się, że zmniejszona ekspresja *Sirt3* hamowała fosforylację kinazy AMP (AMPK) oraz czynnika transkrypcyjnego CREB (ang. *cyclic AMP response element-binding protein*), co z kolei hamowało ekspresję PGC-1 $\alpha$  w mięśniach szkieletowych (Palacios i wsp. 2009). Wyniki te sugerują istotną rolę sirtuiny 3 w utrzymaniu homeostazy energetycznej mięśni przez regulację AMPK i PGC-1 $\alpha$ , choć mechanizmy tej regulacji nie są jeszcze do końca wyjaśnione. Nie wyklucza się współdziałania SIRT3 i SIRT1, gdzie SIRT3 pobudza ekspresję *Pgc-1 $\alpha$* , zaś z kolei SIRT1 przez deacetylację powoduje bezpośrednią aktywację PGC-1 $\alpha$  (Gerhart-Hines i wsp. 2007). Natomiast Kong i wsp. (2010) w mysich komórkach mięśniowych C2C12 zaobserwowali, że PGC-1 $\alpha$  indukuje ekspresję *Sirt3*, z kolei ta przez fosforylację czynnika CREB stymuluje ekspresję koaktywatora. W ten sposób, SIRT3 wspólnie z PGC-1 $\alpha$  wpływają na biogenezę mitochondriów oraz zmniejszają ilość reaktywnych form tlenu w komórkach mięśniowych (Kong i wsp. 2010).

Poznanie wzajemnej regulacji między SIRT3 a PGC-1 $\alpha$ , jako regulatorów biogenezy i funkcji mitochondriów może więc mieć istotne znaczenie w przeciwdziałaniu zmniejszaniu się liczby oraz dysfunkcji tych organelli obserwowanej w starzejących się mięśniach szkieletowych (Marzetti i wsp. 2010). Zauważono, że u osób starszych (75-81 lat), podzielonych na mniej i bardziej aktywne fizycznie, poziom mRNA *Sirt3* i *Pgc-1 $\alpha$*  był o około 50% niższy w porównaniu z młodą grupą kontrolną (Joseph i wsp. 2012). Joseph i wsp. (2012) zasugerowali więc, że obniżenie to może być jedną z przyczyn zwiększonego stresu oksydacyjnego i mutacji w mitochondrialnym DNA, prowadzących do dysfunkcji tych organelli oraz postępującej z wiekiem atrofii mięśni.

Emisję reaktywnych form tlenu (RFT) i zaburzenia funkcji mitochondriów uważa się za jedne z przyczyn insulinooporności w mięśniach szkieletowych ludzi i zwierząt (Anderson i wsp. 2009). Zauważono, że u gryzoni otyłych oraz z cukrzycą typu 1 lub 2 ekspresja *Sirt3* w mięśniach jest o około 50% niższa niż u zdrowych zwierząt (Jing i wsp. 2011). Dodatkowo, myszy *Sirt3*<sup>-/-</sup> charakteryzowały się zwiększonym wytwarzaniem RFT, które powodowały aktywację kinazy JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*) i fosforylację receptora insulinowego w mięśniach, co zaburzało odpowiedź metaboliczną tkanki na działanie insuliny (Jing i wsp. 2011). Wyniki te wskazują na potencjalne znaczenie terapeutyczne sirtuiny 3 w leczeniu cukrzycy, czy poprawianiu wrażliwości mięśni na działanie tegohormonu, także w trakcie starzenia się organizmów.

### 1.3.3 Sirtuina 7

Spośród sirtuin zdecydowanie najmniej wiadomo o sirtuinie 7, jednak na jej istotną rolę w procesach starzenia wskazuje fakt, że myszy pozbawione *Sirt7* żyją prawie dwukrotnie krócej oraz cechuje je przerost i włóknienie mięśnia sercowego, jak i rozwój kardiomiopatii zapalnej (Vakhrusheva i wsp. 2008a).

Jej funkcja biologiczna, możliwa aktywność enzymatyczna, czy substraty molekularne nie zostały jeszcze u ssaków w pełni zidentyfikowane. Wewnątrzkomórkowo *Sirt7* znajduje się w jąderku (Michishita i wsp. 2005), gdzie wskutek interakcji z kompleksem polimerazy RNA I aktywuje transkrypcję rybosomalnego DNA (Ford i wsp. 2006). Grob i wsp. (2009) wskazali, że wznowienie transkrypcji rDNA po podziale komórki odbywa się prawdopodobnie w wyniku zmian konformacyjnych cząsteczki SIRT7 podczas mitozy. Kolejne prace dostarczyły informacji na temat lokalizacji *Sirt7* na ludzkim chromosomie 17q25.3, znajdującym się w regionie częstych zmian

chromosomalnych w ostrych białaczkach i chłoniakach (Voelter- Mahlknecht i wsp. 2006). Ekspresja *Sirt7* określana metodą RT-PCR (ang. *real-time polymerase chain reaction*) może być gatunkowo i tkankowo specyficzna. Z badań przeprowadzonych na mysim modelu doświadczalnym ekspresja mRNA *Sirt7* była wysoka w tkankach o wysokim potencjale proliferacyjnym, jak śledziona czy jądra oraz niska w tkankach postmitotycznych, jak mózg, serce czy mięsień szkieletowy (Ford i wsp. 2006). Z kolei u człowieka obserwowano wysoką ekspresję sirtuiny 7 w mózgu, trzustce, sercu oraz komórkach macierzystych mielopoety CD33+, natomiast niską w jajniku i, podobnie jak u myszy, w mięśniu szkieletowym (Michishita i wsp. 2005; Voelter- Mahlknecht i wsp. 2006).

Na istotną rolę sirtuiny 7 w procesach starzenia po raz pierwszy wskazali Vakhrusheva i wsp. (2008a), prowadząc badania na mysim modelu doświadczalnym. Wspomniani badacze zauważyli, że w sercach starych 23-miesięcznych myszy ekspresja *Sirt7* była o 40% niższa niż u młodych 3-miesięcznych zwierząt. Vakhrusheva i wsp. (2008a) dodatkowo zaobserwowali, że myszy z wyłączoną funkcją genu *Sirt7* charakteryzuje prawie dwukrotnie krótszy średni i maksymalny czas życia (Vakhrusheva i wsp. 2008a). Ponadto, myszy *Sirt7*<sup>-/-</sup> cechował przerost i włóknienie mięśnia sercowego, zwiększona apoptoza kardiomiocytów, a także rozwój kardiomiopatii zapalnej (Vakhrusheva i wsp. 2008a). Zaburzenia morfologiczne mięśnia sercowego związane z hipertrofią czy obumieraniem kardiomiocytów powiązano z hiperacetylacją białka p53, które indukuje proces apoptozy (Alcendor i wsp. 2004; Vakhrusheva i wsp. 2008b). Z kolei białko p53 jest substratem dla *Sirt1* i *Sirt7*, które prawdopodobnie na drodze zależnej od kofaktora NAD<sup>+</sup> powodują jego deacetylację i chronią tym samym przed zanikiem kardiomiocytów, zjawiskiem często spotykanym w starzejącym się mięśniu serca (Vakhrusheva i wsp. 2008a). Potwierdzenie ewentualnego współdziałania, czy jednoczesnej deacetylacji p53 przez obie sirtuiny, wymaga jeszcze dalszych badań.

**Jak dotąd nie poznano roli sirtuiny 7 w mięśniu szkieletowym ssaków ani nie badano wpływu diety restrykcyjnej na ekspresję *Sirt7* w sercu lub mięśniu szkieletowym ludzi i zwierząt.**

#### **CEL 4**

Powyższe dane, a szczególnie informacje uzyskane z badań na transgenicznym myszach, wskazują na istotne znaczenie sirtuin 1, 3 i 7 w funkcjonowaniu mięśni szkieletowych i serca. Dla aktywności enzymatycznej sirtuin niezbędny jest NAD<sup>+</sup>, którego poziom zmienia się zależnie od stanu odżywienia organizmu. Stąd sirtuiny mogą wpływać na metabolizm energetyczny, którego efektorami mogą być mięśnie szkieletowe oraz serce. W związku z tym, że starzeniu towarzyszą zaburzenia metabolizmu energetycznego, postanowiono oznaczyć poziom ekspresji genów sirtuin 1, 3 i 7 w sercu i wybranych typach mięśni szkieletowych młodych i starych szczurów w modelu dynamicznych zmian homeostazy metabolicznej: 30-dniowej diety restrykcyjnej oraz po głodzeniu i następującemu karmieniu *ad libitum*.

## 2. CELE BADAWCZE

Obecnie brak jest danych dotyczących wpływu krótkotrwałej diety restrykcyjnej (lub głodzenia) i ponownego karmienia dietą pełną, na metabolizm mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych u starych osobników. W związku z tym, doświadczalna weryfikacja wpływu wskazanych technik żywieniowych na mięsień sercowy oraz trzy typy mięśni szkieletowych (mieszany, biały i czerwony), w kontekście zmian ekspresji sirtuin w eksperymencie na szczurach, mogłaby stanowić odpowiednik zmian, jakie zachodzą u ludzi w warunkach ograniczonej czasowo diety restrykcyjnej.

Szczegółowe cele badań można przedstawić następująco:

1. Określenie wpływu krótkotrwałej diety restrykcyjnej (KDR) zapoczątkowanej w późnym wieku oraz przywrócenia diety pełnej (*refeeding*) na parametry metabolizmu energetycznego w badanych tkankach mięśniowych.
2. Ocena zmian poziomu ekspresji mRNA i białka sirtuiny 1, sirtuiny 3 i sirtuiny 7 w sercu oraz mięśniach szkieletowych szczurów młodych i starych, w warunkach głodzenia-karmienia oraz KDR i przywrócenia karmienia *ad libitum*.
3. Analiza zmian poziomu mRNA czynników regulujących homeostazę energetyczną - *Pgc-1 $\alpha$*  i *Ppar- $\beta/\delta$*  oraz mięśniowego, insulino-zależnego transportera glukozy-4 (*Glut4*) pod wpływem KDR, głodzenia i następującego karmienia *ad libitum*.
4. Ocena wpływu KDR, głodzenia oraz przywrócenia karmienia dietą pełną przez 2 dni na aktywność enzymatyczną oraz ekspresję na poziomie mRNA – mięśniowego transportera kwasów tłuszczowych, palmitoilotransferazy karnitynowej I (CPT-I), w badanych tkankach mięśniowych młodych i starych szczurów.
5. Ocena wpływu KDR na strukturę mięśnia sercowego starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt.
6. Porównanie u młodych i starych szczurów wpływu głodzenia-karmienia lub KDR i następującego karmienia *ad libitum* na stężenia wybranych metabolitów (triacylogliceroli, wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu frakcji HDL, glukozy, mocznika, białka całkowitego i albumin) oraz na stężenie insuliny i leptyny w surowicy krwi.

### 3. MATERIAŁY

#### 3.1. Zwierzęta

Badania przeprowadzono na samcach szczura rasy Wistar-Han w Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej, w otoczeniu wolnym od swoistych patogenów (*specific pathogen-free*). Szczury stare hodowano pojedynczo, natomiast część młodych zwierząt umieszczono po maksymalnie 4 osobniki w plastikowych klatkach. Zwierzęta trzymano w zamkniętym pomieszczeniu, w warunkach stałej temperatury  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , wilgotności powietrza 55% oraz 12-godzinnym cyklu świetlnym (światło włączane automatycznie o 7:00 rano, wyłączane o 19:00). Szczury karmiono standardową wysterylizowaną paszą Labofeed H, która zawierała 52% węglowodanów, 11% tłuszczu oraz 37% białka. Zwierzęta były pod stałą opieką weterynaryjną.

Doświadczenia żywieniowe przeprowadzono na młodych - dojrzałych (4-5 miesięcy) oraz starych szczurach (23-25 miesięcy) w roku 2010 oraz 2011. W pierwszym eksperymencie 164 szczury (85 młodych i 79 starych) poddano krótkotrwałej diecie restrykcyjnej (KDR) oraz głodzeniu i ponownemu karmieniu (opis doświadczenia w rozdziale Metody). Po zakończeniu doświadczenia szczury znieczulano i usypiano przez dootrzewnową iniekcję 90 mg/kg ketaminy oraz 10 mg/kg ksylazyny i uśmiercano przez pobranie krwi z serca. Następnie do próbek kriogenicznych pobierano mięsień sercowy, mięsień szkieletowy mieszany, wycinany w okolicy m. bocznego uda (MSM). W roku 2011, ze względu na ograniczoną ilość starych zwierząt, powtórzono jedynie eksperyment związany z KDR na 59 szczurach (33 młodych i 26 starych). Z ostatniego doświadczenia pobrano od zwierząt krew, mięsień sercowy, m. prostownik palców (EDL, *extensor digitorum longus*) oraz m. płaszczkowaty łydki (SOL, *soleus muscle*). Wszystkie próbki mięśni natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dodatkowo, od losowo wybranego szczura młodego i starego z grup K, KDR, KDR+2/4/6, pobrano koniuszek serca, który utrwalono w formalinie do badań histologicznych. Surowicę otrzymaną poprzez wirowanie krwi po skrzepnięciu (15 min.,  $4^{\circ}\text{C}$ , 4500 RPM, wirówka Eppendorf 5403B z rotorem 16A4-44) porcjowano i również przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Doświadczenia na zwierzętach zostały przeprowadzone po uzyskaniu zgody kierownika jednostki doświadczalnej (zezwolenie nr 13/2010 z dnia 21.05.2010 r.) oraz zgody Lokalnej Komisji Etycznej na wniosek z dnia 11.04.2011 (uchwała nr 11/2011).

### 3.2. Wykorzystane odczynniki, enzymy, bufor i roztwory

a) **Materiały używane do wykonywania żeli agarozowych:** agarozą TopVision LE, Tris- trihydroksymetyloaminometan (Serva, Niemcy), kwas borowy, bromek etydyny, błękit bromofenolowy, glicerol, cyjan ksylenu

- bufor TBE 5x

Tris	54g
kwas borowy	27,5g
0,5 M roztwór EDTA	20ml
woda destylowana	do 1000 ml
- roztwór barwnika obciążającego do elektroforezy agarozowej

błękit bromofenyłowy	0,25%
cyjan ksylenu	0,25%
glicerol	60 %

b) **Materiały do wykonania oznaczeń stężenia oraz ekspresji białek metodą Western Blotting:** zestaw do izolacji białek Mammalian Cell Extraction Kit (BioVision, USA), inhibitory proteaz (Sigma-Aldrich, Niemcy), DTT- ditiotreitol, DMSO- dimetylosulfotlenek, Bradford Reagent (Sigma-Aldrich, Niemcy), BSA (albumina surowicy bydłowej), Chemiluminescent Peroxidase Substrate (Sigma-Aldrich, Niemcy), Tween 20 (Sigma-Aldrich, Niemcy), NaOH, alkohol metylowy, odtłuszczone mleko w proszku

- płytki 96-dołkowe z dnem płaskim (Medlab Products, Polska)
- żele poliakrylamidowe 10%, 10-dołkowe (Bio-Rad Laboratories, USA)
- bufor obciążający 5x dla prób białkowych (Laemmli)

250 mM Tris/HCl pH 6.8
10% SDS
30% glicerol
5% $\beta$ -merkaptioetanol
0,02% błękit bromofenolowy
dH <sub>2</sub> O
- woda destylowana, dejonizowana (dH<sub>2</sub>O)
- bufor elektrodowy 10x: 0.25M TRIS, 1.9M glicyna, 1% SDS, pH=8.3
- bufor transferowy 1x: 25mM TRIS, 192mM glicyna, 10% metanol, pH=8.3
- błona PVDF (Invitrogen, USA)



- Extra Thick Blot Paper (Bio-Rad, USA)
  - bufor TBS 10x: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/ HCl
  - roztwór Ponceau S do barwienia błon PVDF
    - 10 ml dH<sub>2</sub>O
    - 0,3 ml 100% kwas octowy
    - 0,033 g Ponceau S
    - dH<sub>2</sub>O do 30 ml
  - przeciwciała anty-SIRT1 (AV32386), anty-SIRT3 (AV32389), anty-SIRT7 (SAB3500498), anty-królicze (A6154), anty-kurczacze (A9046) oraz anty-GAPDH (G9295) (Sigma-Aldrich, Niemcy)
  - błona rentgenowska MEDIX XBU (Foma Bohemia, Czechy)
  - wywoływacz do klisz światłoczułych GBX developer/replenisher, utrwalacz do klisz światłoczułych GBX fixer/replenisher (Kodak)
- c) **Wzorce masowe:** dla DNA pUC Mix Marker 8, dla białek - PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas, Litwa)
- d) **Materialy i odczynniki do izolacji całkowitego RNA** (zestaw A&A Biotechnology, Polska), w tym fenozol, chloroform (POCH, Polska), alkohol izopropylowy, roztwór płuczący
- kolumny ze złożem krzemionkowym do izolacji RNA (A&A Biotechnology, Polska)
  - woda redestylowana wolna od nukleaz 0,1% DEPC (v/v)
- e) **Materialy i odczynniki do odwrotnej transkrypcji,** w tym RiboLock™, RNase inhibitor (Fermentas, USA), dNTPs – roztwór aq. zawierający dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stęż. 10 mM każdy (Fermentas, USA), bufor do odwrotnej transkrypcji (Fermentas, USA), oligo(dT)18, odwrotna transkryptaza M-MuLV (Fermentas, USA)
- f) **Materialy i odczynniki do reakcji PCR i Real-time qPCR:** termostabilna polimeraza *Taq* (5U/μl) w buforze 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM DTT, 0,1 M KCl, 0,5% Nonidet P40, 0,5% Tween 20 i 50% glicerol (Fermentas, Litwa), roztwór MgCl<sub>2</sub> o stężeniu 25 mM (Fermentas, Litwa), SybrGreen mix B 2x stężony (A&A Biotechnology, Polska), startery do PCR (Sigma-Aldrich, Niemcy)
- folia do reakcji Real-time qPCR Opti-Seal Optical Disposable Adhesive (Bioplastics, Holandia)

- płytki 96-dołkowe o wysokim profilu do reakcji Real-time qPCR w termocyklerze iCycler (4Titude, Wielka Brytania)
  - płytki 96-dołkowe o niskim profilu do reakcji Real-time qPCR w termocyklerze StepOne Plus (Applied Biosystems, USA)
  - woda redestylowana wolna od nukleaz 0,1% DEPC (v/v)
- g) Odczynniki do wykonania preparatów histologicznych i ich barwienia metodą trójbarwną Masson-Gardner:** formalina, parafina, hematoksylina żelazowa Weigerta A i B, roztwór fuksyny Ponceau, roztwór kwasu fosforowolframowego i Orange-G, zieleń jasna wg Goldnera'a (Carl ROTH, Niemcy), kwas octowy ( $H_3PO_4$ ), ksylen (POCH, Polska)
- h) Zestawy ELISA** do pomiaru stężenia insuliny i leptyny szczurzej (Milipore, Linco Research, USA)
- i) Bufor do oznaczania aktywności CPT:** 250 mM sacharoza (POCH, Polska), 10mM Tris, 0,5 mM EDTA (pH 7,4), 1M i 100 mM Tris (pH 8,0), DTNB - kwas 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoesowy, 100  $\mu$ M palmitoilo-CoA, 20 mM L-karnityna (Sigma- Aldrich, Niemcy)
- j) Dodatkowe materiały zużywalne:**
- końcówki do pipet o poj. do 10, 200 i 1000  $\mu$ l (Starlab, Niemcy)
  - końcówki do pipet o poj. do 200  $\mu$ l, z kapilarnym zakończeniem (Medlab Products, Polska)
  - probówki mrozeniowe 2 ml (Sarstedt, Niemcy)
  - probówki o pojemności 200  $\mu$ l (Molecular  $\beta$ ioProducts, USA)
  - probówki typu Eppendorf o pojemności 0,5; 1,5; 2 ml (Medlab Products, Polska)

### 3.3. Materiały podstawowe i aparatura

- aparat do analizy żeli (Gel Doc<sup>TM</sup> XR, Bio-Rad Laboratories, USA)
- aparat do elektroforezy agarozowej (Kucharczyk, Polska)
- aparat do elektroforezy akrylamidowej (Life Sciences, Wielka Brytania)
- zasilacz aparatu do elektroforezy (Biometra, Niemcy)
- aparat do transferu półsuchego białek (Bio-Rad Laboratories, USA)
- czytnik płytek 96-dołkowych (FL 600 Microplate Fluorescence Reader oraz Epoch, BioTek Instruments Inc., USA)

- homogenizator tkankowy MagNA Lyser (Roche, Szwajcaria)
- homogenizator szklany z tłokiem teflonowym, obj. 2 ml (Witko, Polska)
- kuwety plastikowe, wymiary 60x45x15 cm (VitLab, Niemcy)
- pH-metr uniwersalny (Beckmann, Niemcy)
- kuchenka mikrofalowa AMM 17 E 70 (Amica, Polska)
- pipety automatyczne do izolacji RNA (Eppendorf, Niemcy)
- pipety automatyczne do reakcji PCR (Eppendorf, Niemcy)
- pipety automatyczne 8-kanałowe do reakcji PCR (Eppendorf, Niemcy)
- skaner HP 500 (Hewlett-Packard, USA)
- spektrofotometr do pomiaru stężenia i czystości kwasów nukleinowych NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA)
- spektrofotometr DU-640 - pomiary aktywności enzymatycznych (Beckman Coulter, USA)
- statywy mrozeniowe na probówki 0,2-0,5 ml (Eppendorf, Niemcy)
- termoblok 941S (JW Electronic, Polska)
- termocykler StepOne Plus thermal cycler (Applied Biosystems, USA)
- termocykler iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories, USA)
- termocykler T3Termocycler (Biometra, Niemcy)
- termostat (Epoll, USA)
- waga elektroniczna WPE 70 (Radwag, Polska)
- wirówka 5804R (Eppendorf, Niemcy)
- wytrząsarka typu worteks (IKA, Niemcy)
- mikroton rotacyjny 1130 (R. Jung Heidelberg)

#### **3.4. Wykorzystane programy**

- GeneDoc, wersja 2.6.001 (Bio-Rad Laboratories, USA)
- iCycler Optical System Software, wersja 3.1 (Bio-Rad Laboratories, USA)
- StepOne Software v.2.2.2 (Applied Biosystems, USA)
- OligoAnalyzer 3.1  
(<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>)
- Primer3, wersja 0.4.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)
- Quantity One, wersja 4.6.6 (Bio-Rad, USA)
- Statistica, wersja 10 (StatSoft Inc., USA)

## 4. METODY

### 4.1. Jednostki badawcze uczestniczące w realizacji projektu

Doświadczenia żywieniowe na zwierzętach oraz pobieranie tkanek i narządów przeprowadzono w **Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed)**, p.o. dyrektora: **dr n. farm. Jolanta Paradziej-Łukowicz**.

Analizę ekspresji genów z wykorzystaniem techniki Real-time qPCR oraz pomiar spektrofotometryczny RNA przeprowadzano w **Zakładzie Biologii Komórki Katedry Biotechnologii Medycznej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed**, kierownik: **prof. dr hab. Jacek Bigda** oraz w **Katedrze i Zakładzie Histologii GUMed**, kierownik: **prof. dr hab. Zbigniew Kmieć**.

Pomiaru aktywności enzymów dokonano w **Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed**, kierownik: **prof. dr hab. med. Julian Świerczyński**.

Elektroforezę i transfer białek na błony w metodzie Western Blotting przeprowadzano w **Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej GUMed**, kierownik: **prof. dr hab. Michał Woźniak** oraz w **Katedrze i Zakładzie Histologii GUMed**, kierownik: **prof. dr hab. Zbigniew Kmieć**.

Zdjęcia preparatów histologicznych z serca szczurów zostały wykonane w **Zakładzie Anatomii i Neurobiologii Katedry Anatomii GUMed**, kierownik: **prof. dr hab. med. Janusz Moryś**.

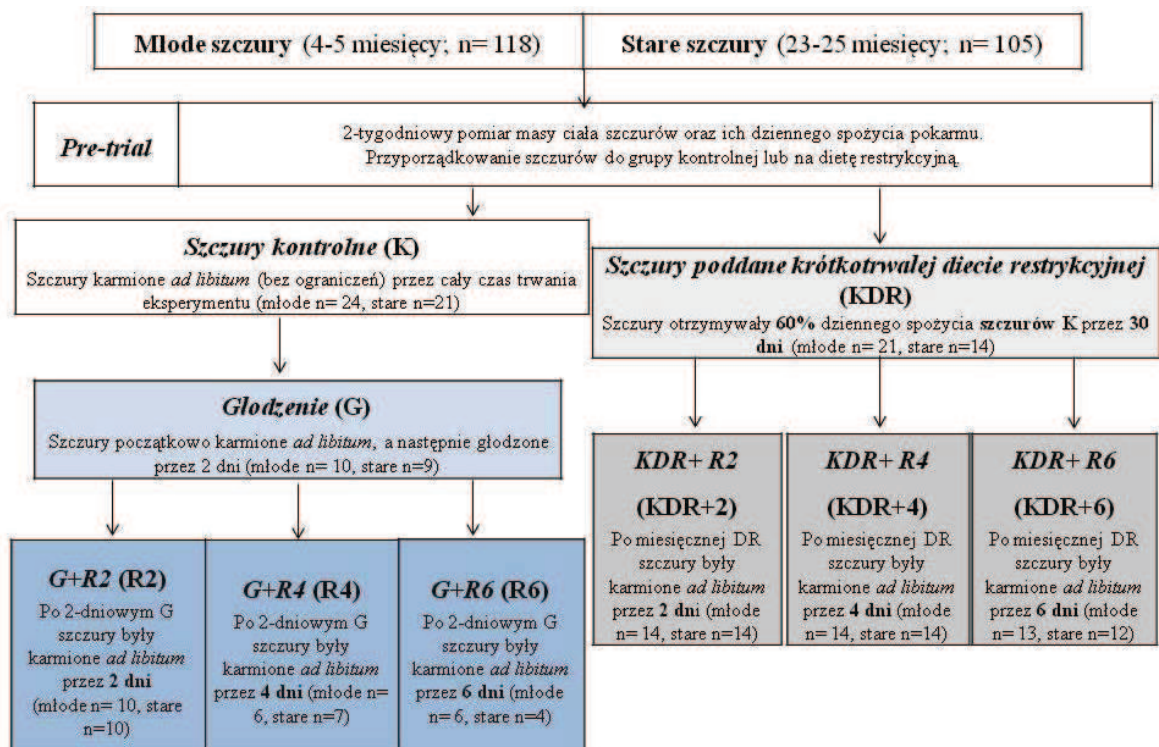
Oznaczenia stężenia metabolitów w surowicy krwi zwierząt zostały wykonane w **Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej Katedry Biochemii Klinicznej GUMed**, kierownik: **prof. dr hab. med. Andrzej Szutowicz**.

### 4.2. Modele doświadczalne

Szczury młode-dojrzałe (4-5 miesięcy) oraz stare (23-25 miesięcy) poddano dwóm eksperymentom żywieniowym: krótkotrwałej diecie restrykcyjnej oraz głodzeniu i ponownemu karmieniu *ad libitum*, czyli bez ograniczeń (Ryc. 5). Wszystkie zwierzęta miały swobodny dostęp do świeżej wody.

#### a) Model głodzenie – karmienie

W pierwszych dwóch tygodniach doświadczenia (*pre-trial*) szczury codziennie ważono, w celu zbierania danych oraz przystosowania zwierząt do nowej sytuacji. Następnie szczury podzielono na 5 grup doświadczalnych (po 4-19 zwierząt) w obrębie każdej kategorii wiekowej (Ryc. 5). Grupa kontrolna (K) miała swobodny dostęp do wody i paszy przez cały okres trwania doświadczenia. Grupa zwierząt (G) była głodzona przez 48 godzin przed uśpieniem. Szczury z pozostałych 3 grup (R2, R4, R6) poddano głodzeniu przez 48 godzin, a następnie karmieniu *ad libitum* (*refeeding*), odpowiednio przez kolejne 2, 4 lub 6 dni. Masę ciała szczurów mierzono przed i po głodzeniu, przy wprowadzeniu diety pełnej oraz bezpośrednio przed uśpieniem. Głównym wykonawcą tej części doświadczenia była dr Agata Wrońska (Rozprawa doktorska, Gdańsk 2013).



Ryc. 5. Schemat przedstawiający eksperyment żywieniowy, przeprowadzony na młodych i starych szczurach. W nawiasach podano liczebność poszczególnych grup doświadczalnych.

## b) Krótkotrwała dieta restrykcyjna

Doświadczenie związane z KDR było wykonane dwukrotnie. W pierwszym, głównym wykonawcą była dr Agata Wrońska, w kolejnym (w roku 2011) całą procedurę wykonałam samodzielnie. Oba doświadczenia były przeprowadzone jak opisano poniżej.

Na dwa tygodnie przed wprowadzeniem DR, zmierzono dobowe spożycie pokarmu przez szczury oraz określano ich ciężar. Spożycie paszy przez 1 osobnika mierzono jako różnicę między ilością paszy podanej na początku fazy jasnej i pozostałej w karmidełku po

24 godzinach. W oparciu o tak zebrane dane ustalono średnią ilość pokarmu spożywanego przez szczury kontrolne karmione *ad libitum* oraz wyznaczono wielkość porcji paszy odpowiadającą 60% średniego dobowego spożycia przez szczury kontrolne: 15 g dla szczurów młodych i 13 g dla starych.

Szczury w wieku 4-5 miesięcy i 23-25 miesięcy podzielono na 5 grup doświadczalnych (Ryc. 5), po 8-11 zwierząt w pierwszym doświadczeniu oraz po 5-11 w drugim eksperymencie. Grupa kontrolna (K) miała swobodny dostęp do wody i paszy. Pozostałe grupy zwierząt przez okres 30 dni otrzymywały codziennie (około godziny 9:00 rano) 60% paszy z dziennego spożycia szczurów kontrolnych, przy nieograniczonym dostępie do świeżej wody. Następnie, gdy część szczurów uśpiono po 30 dniach (grupa KDR), pozostałe grupy zwierząt (KDR+2, KDR+4, KDR+6) karmiono dietą pełną przez kolejne 2, 4 lub 6 dni przed uśmierceniem. Przywrócenie diety pełnej zwierzętom ma symulować sytuację, w której osoba stosująca restrykcję kaloryczną rozpoczyna normalne odżywianie.

Masę ciała szczurów mierzono przed wprowadzeniem diety, w trakcie trwania diety – co drugi dzień, po jej zakończeniu, po przywróceniu diety pełnej oraz bezpośrednio przed uśpieniem.

#### **4.3. Oznaczanie aktywności palmitoilotransferazy karnitynowej I**

Próbki mięśni szkieletowych oraz serca (100 mg) homogenizowano w szklano-teflonowym homogenizatorze w 1 ml schłodzonego (4°C) buforu o składzie: 250 mM sacharoza, 10 mM Tris-HCl oraz 0,5 mM EDTA (pH 7.4). Następnie homogenaty wirowano przez 3 minuty w 300 g w temperaturze 4°C. Supernatant wykorzystano do spektrofotometrycznego oznaczenia aktywności CPT-I oraz pomiaru stężenia białka. Stężenie białek w uzyskanych homogenatach mierzono względem wystandaryzowanych rozcieńczeń BSA, używając odczynnika Bradford Reagent (Sigma-Aldrich), według zaleceń producenta. Pomiar aktywności enzymu wykonywano w świeżo przygotowanych ekstraktach. Do kuwet, umieszczonych w termostacie (ok. 37 °C), wprowadzano mieszaninę reakcyjną o składzie: homogenat tkankowy (bufor o składzie j.w., pH 7.4), 1 mM DTNB (rozpuszczany w 1M Tris) oraz 100 µM palmitoilo-CoA (rozpuszczany w H<sub>2</sub>O) i dokonywano pomiaru zmian absorbancji bez substratu w czasie 5 minut. Następnie, do mieszaniny reakcyjnej dodawano L-karnitynę do stężenia 1.67 mM (rozpuszczaną w 100 µM Tris, pH 8.0) i dokonywano ponownego pomiaru zmian absorbancji w czasie

kolejnych 5 minut. Objętość końcowa roztworu wynosiła 1 ml. Oba pomiary spektrofotometryczne wykonano przy długości fali 412 nm za pomocą spektrofotometru Beckman DU-640.

Aktywność CPT-I wyliczono ze wzrostu absorbancji przy długości fali 412 nm w obecności palmitoilo-CoA i L-karnityny. W obliczeniach wzięto pod uwagę zmianę absorbancji w mieszaninie reakcyjnej bez dodawania substratu. Aktywność enzymu obliczono jako różnicę wzrostu absorbancji z dwóch pomiarów: z oraz bez udziału L-karnityny, w stosunku do całkowitej ilości białka zawartego w homogenacie tkankowym (nmol/min/ml).

#### **4.4. Przygotowanie preparatów histologicznych**

W trakcie pobierania mięśnia sercowego młodych i starych szczurów, okolice koniuszka serca delikatnie odcięto i umieszczono w 4% formalinie na okres 3 dni, w celu utrwalenia tkanki. Tak utrwalone tkanki dokładnie wypłukano w wodzie bieżącej przez 12 godzin w celu usunięcia utrwalacza z komórek, a następnie odwodniono w alkoholach o wzrastającym stężeniu, zaczynając od 50%, poprzez 96%, a kończąc na alkoholu odwodnionym 99,8% . W kolejnym etapie skrawki zostały przepojone ksylenem w celu całkowitego pozbycia się wody z komórek. Tak przygotowane tkanki przepojono parafiną miękką (52-54°C) a następnie twardą (57-58°C). Tkanki zatopiono w bloczkach parafinowych. Następnie bloczki parafinowe z koniuszkami serca skrojono na skrawki o grubości 6 µm, za pomocą mikrotomu rotacyjnego 1130 (R. Jung Heidelberg). Tak przygotowane fragmenty tkanki serca naklejono na szkiełka podstawowe, odparafinowano i przygotowano do barwienia. W celu określenia powierzchni zajmowanej w mięśniu sercowym przez tkankę łączną włóknistą, zostało wykonane barwienie trójbarwne wg Massona-Goldnera (Carl ROTH, Art. No. 3459), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. W wyniku barwienia jądra komórkowe są ciemnofioletowe, cytoplazma włókien mięśniowych – czerwona, erytrocyty – pomarańczowe, natomiast tkanka łączna włóknista – zielona. Zdjęcia preparatów wykonano na mikroskopie odwróconym Nikon Eclipse TE 300 z kamerą XC Olympus.

#### **4.5. Izolacja całkowitego komórkowego RNA**

Całkowite RNA z serca i mięśni szkieletowych izolowano przy użyciu zestawu Total RNA Prep Plus według zmodyfikowanej procedury proponowanej przez producenta

(A&A Biotechnology). Zestaw opiera się na zdolności ziół krzemionkowych do wiązania kwasów nukleinowych w obecności wysokich stężeń soli chaotropowych wg zmodyfikowanej procedury Chomczyńskiego i Sacchi (1987).

Do zamrożonych fragmentów mięśni, umieszczonych w próbkach kriogenicznych, dodawano 800  $\mu$ l fenozolu i inkubowano przez 5 min. w temperaturze pokojowej. Następnie próbki homogenizowano przy pomocy kulek cyrkonowych w homogenizatorze tkankowym MagNALyser (Roche Diagnostics) przez 90 sek. przy prędkości 7000 RPM. Kolejno, materiał inkubowano w termobloku 941S (JW Electronic) w temperaturze 50°C przez 10 min. Następnie dodawano 200  $\mu$ l chloroformu i worteksowano przez 15 sek. Po 3 min. inkubacji w RT mieszaninę wirowano (10 min., 12 tys. RPM). Do nowej próbki, zawierającej 200  $\mu$ l izopropanolu, przenoszono górną frakcję zawierającą RNA. Próbkę delikatnie mieszano, po czym całość nanoszono na kolumnę do izolacji RNA. Po wirowaniu (1 min., 12 tys. RPM.) przenoszono kolumnę do nowej próbki 2ml i dodawano 700  $\mu$ l roztworu płuczącego A1 i ponownie wirowano (1 min., 12 tys. RPM.). Płukanie powtarzano jeszcze dwukrotnie przy pomocy 350  $\mu$ l i 200  $\mu$ l roztworu płuczącego A1, każdorazowo wylewając przesącz po wirowaniu. Ostatnie wirowanie przeprowadzano przez 2 min. w celu dokładnego osuszenia złoza. Osuszoną kolumnę umieszczano w nowej próbce typu Eppendorf 1,5 ml i do złoza znajdującego się na dnie kolumny dodano 100  $\mu$ l jałowej i wolnej od RNaz wody destylowanej. Po 3-minutowej inkubacji w RT próbki wirowano (2 min., 12 tys. RPM). Przesącz zawierający RNA przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania dalszych analiz.

Przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 1000 mierzono stężenie ( $A_{260nm}$ ) i czystość ( $A_{260nm/280nm}$  oraz  $A_{260nm/230nm}$ ) uzyskanego RNA. Daną próbę RNA uznawano za czystą dla wartości  $A_{260nm/280nm}$  w granicach 1.8-2.0.

#### **4.6. Odwrotna transkrypcja**

Reakcję odwrotnej transkrypcji (RT) przeprowadzano na matrycy 1-2  $\mu$ g RNA z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas). W celu uzyskania wyłącznie cDNA z matrycowego RNA jako starterów użyto oligomerów oligo(dT)<sub>18</sub>. Matrycę RNA wraz z 1  $\mu$ l oligo(dT)<sub>18</sub> w roztworze wodnym inkubowano przez 5 min. w temp. 70°C. Do schłodzonej mieszaniny dodawano 8,5  $\mu$ l mieszaniny do reakcji odwrotnej transkrypcji (Master Mix) o składzie przedstawionym w Tab. 2,



mieszano i wirowano. Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w termocyklerze przez 60 min. w temp. 42°C, a następnie 5 min. w temp. 95°C celem inaktywacji enzymu. Uzyskane cDNA przechowywano w -80°C do czasu wykonania dalszych analiz.

Tab. 2. Skład mieszaniny do reakcji odwrotnej transkrypcji.

Składnik mieszaniny	Objętość (μl)	Stęż. końcowe
Rozt. wodny RNA	10,5	1-2 μg RNA
oligo(dT) <sub>18</sub>	1	0,5 μg (100 pmol)
5x bufor do odwrotnej transkrypcji	4	1 x
RiboLock (inhibitory RNaz)	0,5	20 u
mieszanina dNTP (10 mM każdy)	2	1 mM
odwrotna transkryptaza M-MuLV	2	40 u
Objętość końcowa	20 μl	

#### 4.7. Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Metoda Real-time qPCR (RT-qPCR, ang. *Real time- quantitative PCR*) wykorzystując techniki fluorescencyjne, pozwala na monitorowanie przyrostu ilości produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Pomiar ten oparty jest na różnicy w długości fali wzbudzenia i emisji fluoroforu wiążącego się z DNA (Provenzano i Mocellin 2007). Jako fluorofor zastosowano barwnik SybrGreen (A&A Biotechnology, Polska), wiążący się z dwuniciowym DNA. Sygnał emitowany przez fluorofor jest wprost proporcjonalny do ilości amplikonu. Do zalet użycia wspomnianego systemu detekcji należy możliwość dostosowania go do większej ilości układów amplifikacyjnych oraz niska cena produktu. Z kolei jego wadą jest niespecyficznosc detekcji. Stąd, w celu uniknięcia odczytu sygnału od fluoroforu wiążącego się z niespecyficznymi produktami reakcji, dla każdego amplikonu wyznaczono krzywą topnienia, a temperaturę odczytu fluorescencji ustalono <3°C od temp. topnienia produktu szukanego (rozprawa doktorska P. Wierzbickiego, Gdańsk 2007).

Projektowanie układów amplifikacyjnych wszystkich badanych genów oparto na sekwencjach mRNA dostępnych w bazie Ensembl Genome Browser ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Sekwencje starterów wyznaczono przy użyciu oprogramowania Primer3, wersja 0.4.0. Z kolei, za pomocą programu Vector NTI otrzymane sekwencje przeanalizowano pod kątem temperatury topnienia oligonukleotydów, % GC, obecności struktur drugorzędowych i

występowania zjawiska primer-dimer. Sekwencje starterów i długość amplikonów przedstawiono w Tab. 3.

Tab. 3. Startery wykorzystywane do amplifikacji badanych genów.

Gen	Sekwencje starterów (5'→3') (A: sensowny, B: antysensowny)	Długość amplikonu (par zasad)
<i>Sirt1</i>	A: CAGAACCACCAAAGCGGAAAAA B: GAAACCCAGCTCCAGTCAGAA	109 pz
<i>Sirt3</i>	A: AAGCTGGTTGAAGCTCATGGGTC B: TCCAGGGAGGTCCCAAGAATGAG	242 pz
<i>Sirt7</i>	A: TGATGATGTAATGCGGCTCCTC B: CTGCTCCTGCACAGTGACTTCC	147 pz
<i>Cpt-1b</i>	A: ATGTTTGACCCAAAGCAGTACCCC B: TCGCCTGCGATCATGTAGGAAAC	101 pz
<i>Glut4</i>	A: AGGCCGGGACACTATACCCTATTC B: AAACCTGAAGGGAGCCAAGCACAG	178 pz
<i>PGC-1α</i>	A: CACGTTCAAGGTCACCCTACAGC B: TAAATCACACGGCGCTCTTCAAT	152 pz
<i>PPAR-β/δ</i>	A: ACAAGGCTCAGGCTTCCACTAC B: TCCGATCGCACTTCTCGTACTTG	105 pz
<i>36B4</i>	A: CTCAGTGCCTCACTCCATCA B: GGGGCTTAGTCGAAGAGACC	255 pz
<i>cycloA</i>	A: TGTCTCTTTTCGCCGCTTGCTG B: CACCACCCTGGCACATGAATCC	223 pz

Kolejnym etapem było wyznaczenie krzywej wzorcowej oraz wydajności uzyskanych układów amplifikacyjnych. W tym celu sporządzono mieszaninę matrycowego cDNA (z 10-15 prób) z każdej badanej tkanki szczurów i w 2 powtórzeniach dla 6 rozcieńczeń seryjnych 1:2 sprawdzono działanie poszczególnych układów starterów. Za optymalne warunki reakcji przyjmowano: wydajność amplifikacji w granicach 100% ±10%, współczynnik korelacji  $R^2 = 1 \pm 0,1$  oraz nachylenie krzywej =  $-3,42 \pm 0,35$  (rozprawa doktorska P. Wierzbieckiego, Gdańsk 2007). Zoptymalizowane profile temperaturowo-czasowe dla poszczególnych układów reakcyjnych przedstawia Tab. 4.

Reakcje przeprowadzano w dwóch powtórzeniach dla każdej próby, na płytkach 96-dołkowych, w termocyklerze iCycler iQ Real-Time PCR (Bio-Rad) oraz termocyklerze StepOne Plus (Applied Biosystems, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tab. 5.

Poziom ekspresji genów: *Sirt1*, *Sirt3*, *Sirt7*, *Cpt-1b*, *Glut4*, *Pgc1α*, *Ppar-β/δ* wyznaczono względem poziomu mRNA genów konstytutywnych (HKG, ang. *housekeeping genes*): kwaśnej rybosomalnej fosfoproteiny P0 (*36B4*) oraz cyklofiliny A

(*cycloA*, *Ppia*), stosując porównawczą analizę ilościową wg Livaka (Livak i Schmittgen 2001): **Wartość ekspresji genu X** =  $2^{-\Delta Ct}$ , gdzie  $\Delta Ct = Ct_x - Ct_{HKG}$

oraz  $Ct_{HKG}$  = średnia ( $Ct_{cycloA,36B4}$ )

$Ct$  (ang. *threshold cycle*) – numer cyklu, w którym reakcja wchodzi w fazę logarytmiczną, obliczany przez oprogramowanie termocyklera.

W metodzie tej uzyskana wartość odpowiada umownej liczbie transkryptów genu X w odniesieniu do średniej sumy transkryptów genów referencyjnych. Stąd, możliwe jest statystyczne porównanie ze sobą poziomu ekspresji genu X w różnych tkankach i prześledzenie jego zmian w zmieniających się warunkach doświadczalnych (rozprawa doktorska P. Wierzbickiego).

Tab. 4. Profile temperaturowo-czasowe reakcji RT- qPCR dla badanych genów.

Analizowany gen										
Etap		<i>Sirt1</i>	<i>Sirt3</i>	<i>Sirt7</i>	<i>Cpt-1b</i>	<i>Glut4</i>	<i>PGC-1a</i>	<i>PPAR-β</i>	<i>36B4</i>	<i>cycloA</i>
1	Wstępna denaturacja	95 °C / 5 min.								
2	Właściwa denaturacja	95 °C / 15 sek.								
3	Przyłączanie starterów (30s)	57 °C	58 °C	58-59 °C	57,5 °C	58 °C	57-58 °C	57 °C	57 °C	57 °C
4	Wydłużanie	72 °C / 30 sek								
5	Odczyt	80°C / 10 sek								
6	Inkubacja	4 °C / ∞								
Liczba cykli (powtórzenie p. 2-4)		40								

Tab. 5. Skład mieszaniny reakcji RT- qPCR dla każdego z układów amplifikacyjnych.

Składnik mieszaniny	Objętość (μl) na 1 reakcję	Stęż. końcowe
cDNA	1	
SybrGreen mix B	8	1 x
Starter A	0,33	0,165 μM
Starter B	0,33	0,165 μM
ddH <sub>2</sub> O	8,34	
Objętość końcowa 18 μl		

#### 4.8. Pomiar względnej ilości białek SIRT1, SIRT3 i SIRT7 metodą Western blotting

W pierwszym etapie przeprowadzono ekstrakcję białek z fragmentów zamrożonych mięśni przy pomocy zestawu Mammalian Cell Extraction Kit (BioVision) według zaleceń producenta. Stężenie białek w uzyskanych lizatach mierzono względem wystandaryzowanych rozcieńczeń BSA używając odczynnika Bradford Reagent (Sigma-Aldrich), według zaleceń producenta. Następnie przygotowywano próby białkowe o stężeniu 5 mg/ml w buforze Laemmli z dodatkiem 1%  $\beta$ -merkaptoetanolu, które denaturowano przez 5 min. w 100°C. Tak przygotowane próby nanoszono po 20  $\mu$ g na 10% żele poliakrylamidowe (Bio-Rad Laboratories) i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w warunkach denaturujących, przy stałym napięciu 90 V w żelu zagęszczającym i 110 V w żelu rozdzielającym. W 10-studzienkowym żelu znajdowało się 9 prób badanych oraz marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas). Po zakończonej elektroforezie przeprowadzono transfer białek na błonę PVDF w aparacie do transferu półsuchego, przy stałym natężeniu prądu 260 mA i maksymalnym napięciu 25 V. Po 1-godzinnym transferze błonę PVDF barwiono przez 1-2 min. w roztworze Ponceau S, a następnie odbarwiono w wodzie. Barwienie to posłużyło jako kontrola ilości białka nakładanego do każdej studzienki żelu oraz jakości transferu. Po odbarwieniu błony niespecyficzne miejsca wiązania białek blokowano 5% roztworem odtłuszczonego mleka w TBS z 0,1% Tween-20 (TBS-T) przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Następnie błonę inkubowano z I-rzędowym przeciwciałem: anti-Sirt1 (1:5000, 1:2500, 1:1500, 1:1000, 1:800), anti-Sirt3 (1:5000) lub anti-Sirt7 (1:2000) (Sigma-Aldrich) przez noc w 4°C. Następnego dnia, po płukaniu (3x 15 min. w TBS-T) błonę inkubowano z II-rzędowym przeciwciałem anti-króliczym (1:15000) dla SIRT1 oraz SIRT3, lub anti-kurczaczym dla SIRT1 i SIRT7 (1:15000) przez 2 godz. w temperaturze pokojowej. Po ponownym płukaniu (3x 15 min. w TBS-T) powstałe kompleksy antygen-przeciwciało wykrywano za pomocą substratu chemiluminescencyjnego dla peroksydazy chrzanowej sprzężonej z przeciwciałem II-rzędowym (Sigma-Aldrich), przeprowadzając ekspozycję błony wobec kliszy światłoczułej przez okres od 5 sekund do 5 minut. Intensywność prążków została przeanalizowana densytometrycznie przy pomocy oprogramowania Quantity One, w. 4.6.6 (Bio-Rad). Pomiar względnej ilości SIRT1, SIRT3 i SIRT7 oceniano w stosunku do białka referencyjnego: dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH, 1:50000). Obliczenia wykonano na podstawie dwóch prób tkanek zwierząt z każdej grupy doświadczalnej i wiekowej.

#### **4.9. Pomiar stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi szczurów metodą ELISA**

Stężenie insuliny i leptyny w surowicy krwi szczurów zmierzono przy pomocy gatunkowo-specyficznego testu immunoenzymatycznego ELISA (Millipore, Linco Research) według zaleceń producenta. W teście tym, hormony szczura wiązane są przez specyficzne przeciwciała, którymi opłaszczono są dołki płytki testowej. Do tego kompleksu przyłączane są następnie przeciwciała detekcyjne sprzęgnięte z peroksydazą chrzanową. Substrat chromogenny (3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna) przekształcany jest przez peroksydazę w barwny produkt. Wielkość absorbancji produktu odczytywana przy długości fali 590 nm (FL600 Microplate Fluorescence Reader, BioTek) jest proporcjonalna do ilości antygenu. Stężenie insuliny i leptyny w badanych próbkach odczytywano z krzywej wzorcowej, wyznaczonej dla znanych rozcieńczeń antygenu przy pomocy oprogramowania spektrofotometru.

#### **4.10. Oznaczanie poziomu metabolitów w surowicy krwi szczurów**

Poziom parametrów metabolicznych w surowicy szczurów z obu grup wiekowych: triacylogliceroli, wolnych kwasów tłuszczowych, cholesterolu, cholesterolu frakcji HDL, glukozy, mocznika, albumin i białka całkowitego zmierzono przy pomocy dostępnych komercyjnie standardowych testów diagnostycznych w Zakładzie Medycyny Laboratoryjnej Katedry Biochemii Klinicznej GUMed.

#### **4.11. Analiza statystyczna wyników**

Analizę statystyczną wyników badań przeprowadzono przy pomocy programu STATISTICA w. 10 (StatSoft). Normalność rozkładu przypadków w grupach badawczych sprawdzano przy pomocy testu W Shapiro-Wilka. Ze względu na niską liczebność grup i brak rozkładu normalnego w wielu badanych grupach, do testowania istotności różnic stosowano nieparametryczny test U Manna-Whitneya (porównywanie dwóch grup) oraz test kolejności par Wilcoxon (porównywanie wielu grup). Do określenia współczynnika korelacji między grupami posłużono się testem Spearmana. Za różnice statystycznie znamienne przyjmowano wartości, dla których  $p < 0,05$  (oznaczane symbolem \*), zaś wysoce znamienne  $p < 0,01$  (oznaczane symbolem \*\*) oraz  $p < 0,001$  (oznaczane symbolem \*\*\*).

## 5. WYNIKI

### 5.1. Charakterystyka zwierząt w modelu głodzenie-karmienie

#### 5.1.1 Zmiany masy ciała zwierząt

Średnia masa ciała starych szczurów była o około 30% wyższa niż u młodych zwierząt na każdym etapie doświadczenia (Tab. 6). Dwudniowe głodzenie spowodowało zmniejszenie masy ciała młodych i starych szczurów o odpowiednio 8,4% i 5,9% (Tab. 6). Po wprowadzeniu diety pełnej młode szczury nie odzyskały wyjściowej masy ciała. Z kolei stare zwierzęta, po 6 dniach karmienia dietą pełną odzyskały masę szczurów kontrolnych (Tab. 6).

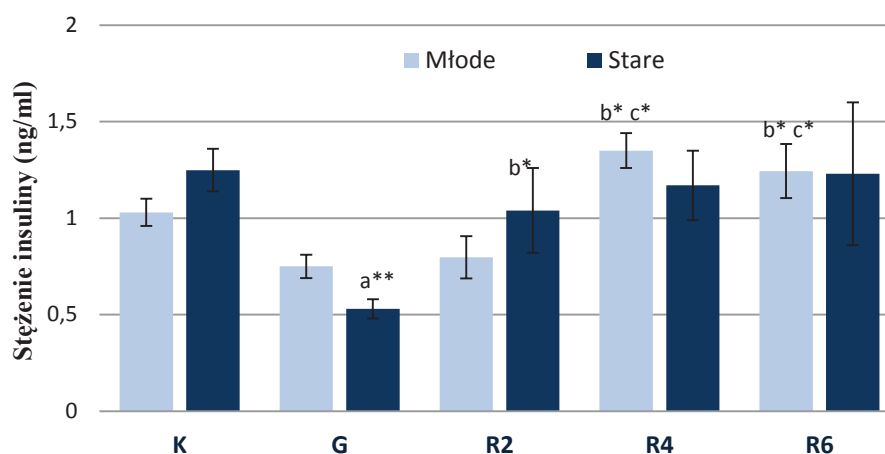
Tab. 6. Zmiany masy ciała szczurów w modelu głodzenie- karmienie, mierzone w odniesieniu do masy początkowej – górny wiersz oraz w stosunku do masy tych samych zwierząt po dwóch dobach głodzenia – dolny wiersz.

		Zmiana masy ciała szczurów (%) ± SE			
	K (g)	G	R2	R4	R6
Młode szczury	375 ± 6,1	-8,4 ± 0,3 <sup>a***</sup>	-2,6 ± 0,4	-1,9 ± 0,3	-1,2 ± 0,4
			-----	-----	-----
			6,8 ± 0,6	5,8 ± 0,3	5,8 ± 0,7
N	19	10	10	6	6
Stare szczury	526 ± 11,2 <sup>A***</sup>	-5,9 ± 0,3 <sup>A**</sup>	-1,1 ± 0,2 <sup>A**</sup>	-0,7 ± 0,3 <sup>A**</sup>	0,2 ± 0,7 <sup>A*</sup>
			-----	-----	-----
			4,6 ± 0,2	4,8 ± 0,5	9,6 ± 1,4
N	17	9	10	7	4

Wartości przedstawiają średnią wyrażoną w % ± SE. Oznaczenia: **K**- szczury kontrolne, **G**- szczury głodzone, **R2**, **R4**, **R6** – szczury głodzone przez 48 godzin, a następnie karmione *ad libitum* przez wskazaną liczbę dni. **N**- ilość osobników w danej grupie doświadczalnej, **a** – wartość znamienne różna względem grupy K w danej grupie wiekowej, **b** – wartość znamienne różna względem zwierząt z grupy G w danej grupie wiekowej, **c**- wartość znamienne różna względem zwierząt z grupy R2 w danej grupie wiekowej, **d**-wartość znamienne różna względem zwierząt z grupy R4 w danej grupie wiekowej; **A** – wartość znamienne różna (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) względem grupy młodych zwierząt poddanych tej samej procedurze żywieniowej.

### 5.1.2 Zmiany stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi młodych i starych szczurów

Dwa dni głodzenia obniżyło **stężenie insuliny** w surowicy krwi młodych i starych zwierząt o odpowiednio 27% i 58% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 6). Przywrócenie diety pełnej spowodowało wzrost stężenia insuliny w surowicy krwi młodych szczurów dopiero w czwartym dniu karmienia dietą pełną, przywracając tym samym poziom stężenia szczurów kontrolnych. U starych zwierząt, dwa dni karmienia *ad libitum* zwiększyło stężenie insuliny o 96% (względem grupy KDR) i przywróciło stężenie zwierząt kontrolnych (Ryc. 6).



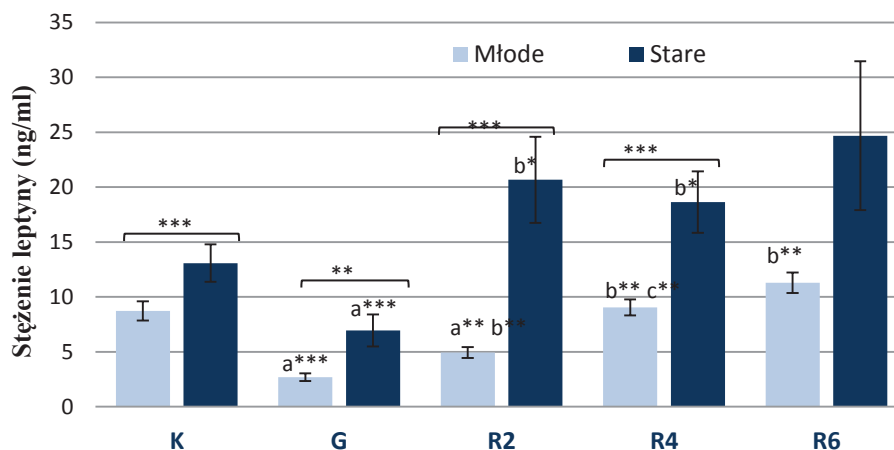
Ryc. 6. Stężenie insuliny (ng/ml) w surowicy krwi szczurów głodzonych – karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

**Średnie stężenie leptyny** było istotnie wyższe w surowicy krwi starych szczurów niż u młodych zwierząt na każdym etapie doświadczenia (Ryc. 7). Dodatkowo, zaobserwowano pozytywną korelację między stężeniem leptyny a masą ciała szczurów młodych ( $r = 0.67$ ,  $p = 10^{-6}$ ) oraz starych ( $r = 0.51$ ,  $p = 0,0019$ ).

Głodzenie przez 48 godzin obniżyło stężenie leptyny o 69% w surowicy krwi **młodych szczurów** w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 7), natomiast karmienie *ad libitum* spowodowało wzrost stężenia hormonu o 84% (względem grupy głodzonej). Po czterech dniach karmienia *ad libitum* stężenie leptyny wzrosło do poziomu kontroli (Ryc. 7).

U **starych szczurów** dwa dni głodzenia obniżyło stężenie leptyny o 47% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 7). W odróżnieniu do młodych zwierząt, już po dwóch dniach karmienia *ad libitum* stężenie hormonu wzrosło u starych szczurów o 197%

względem grupy głodzonej, przewyższając tym samym poziom podstawowy o 58%, choć wynik ten nie był istotny statystycznie (Ryc. 7). Wysokie stężenie leptyny utrzymało się w surowicy krwi starych zwierząt do końca okresu karmienia *ad libitum*.



Ryc. 7. Stężenie leptyny (ng/ml) w surowicy krwi szczurów głodzonych – karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

### 5.1.3 Zmiany stężeń wybranych metabolitów w surowicy krwi szczurów młodych i starych

Zmiany stężeń podstawowych metabolitów w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych, poddanych głodzeniu – karmieniu przedstawiono w tabeli 7.

Średnie **stężenie mocznika i albuminy** było niższe w surowicy krwi starych szczurów kontrolnych niż u młodych zwierząt o odpowiednio 22,6% i 11,6% (Tab. 7). Odwrotną sytuację odnotowano w przypadku stężenia białka całkowitego, które o 4,6% było wyższe u dwuletnich szczurów niż u młodych zwierząt. Dwudniowe głodzenie oraz karmienie dietą pełną nie wywołało zmian stężenia mocznika, albuminy ani białka całkowitego w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Tab. 7). Wyjątek stanowi obniżenie poziomu mocznika o 18,5% względem grupy kontrolnej oraz 21,1% względem grupy głodzonej ( $p=0,05$ ) u młodych szczurów karmionych *ad libitum* przez sześć dni (Tab. 7).

Średnie **stężenie glukozy** było porównywalne w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych (Tab. 7). Pod wpływem głodzenia odnotowano obniżenie stężenia glukozy u młodych i starych zwierząt o odpowiednio 39,7% i 37,6% w porównaniu do grup kontrolnych. Przywrócenie diety pełnej po dwóch dniach spowodowało zwiększenie stężenia glukozy o 91,6% u młodych szczurów, co stanowiło ponad 15% wzrost powyżej



stężenia podstawowego. U starych szczurów karmienie *ad libitum* przez dwa dni spowodowało mniejszy niż u młodych zwierząt wzrost stężenia glukozy o 40,5%, co odpowiadało stężeniu u szczurów kontrolnych (Tab. 7).

Średnie **stężenie triacylogliceroli (TG)** w surowicy krwi starych szczurów kontrolnych było o 64% wyższe niż u młodych zwierząt (Tab. 7). Głodzenie przez 48 godzin spowodowało 26% ( $p= 0,088$ ) obniżenie stężenia TG w surowicy młodych szczurów względem kontroli, jednak po wprowadzeniu 4-dniowej diety pełnej poziom ten wzrósł o 52% ponad stężenie podstawowe. U starych szczurów głodzenie nie wywołało zmian stężenia TG w surowicy w porównaniu do grupy kontrolnej (Tab. 7). W 6 dniu karmienia *ad libitum* zanotowano wzrost stężenia TG o 66,1% w porównaniu do grupy kontrolnej.

Średnie **stężenie wolnych kwasów tłuszczowych (WKT)** było dwukrotnie wyższe w surowicy krwi starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt (Tab. 7). Dwa dni głodzenia spowodowały 4-krotne obniżenie stężenia WKT u młodych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej. W ciągu dwóch dni karmienia *ad libitum* stężenie WKT u młodych zwierząt wróciło do poziomu podstawowego, natomiast w kolejnych 4 i 6 dniach karmienia ponownie wzrosło do wartości dwukrotnie wyższej niż u szczurów kontrolnych (Tab. 7).

U starych szczurów nie zaobserwowano zmian stężenia WKT pod wpływem dwudniowego głodzenia w porównaniu do grupy kontrolnej. Refeeding obniżył stężenie WKT w stosunku do kontroli o 53,6% po 2 dniach oraz o 61% po 6 dniach karmienia dietą pełną (Tab. 7).

Średnie **stężenie cholesterolu całkowitego (ChC)** było o około 50% wyższe w surowicy krwi starych szczurów niż u młodych zwierząt na każdym etapie doświadczenia (Tab. 7). U młodych szczurów głodzenie nie miało wpływu na średnie stężenie ChC w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei przywrócenie karmienia *ad libitum* przez dwa dni obniżyło stężenie ChC w surowicy krwi młodych zwierząt o 25,9% względem grupy głodzonej (Tab. 7). U starych szczurów, głodzenie oraz karmienie dietą pełną nie miało wpływu na średnie stężenie ChC (Tab. 7).

Średnie **stężenie cholesterolu HDL (Ch-HDL)** było o około 30% wyższe w surowicy krwi starych szczurów niż u młodych zwierząt na każdym etapie doświadczenia (Tab. 7). U szczurów z obu grup wiekowych głodzenie oraz karmienie dietą pełną nie miało wpływu na średnie stężenie Ch-HDL w porównaniu do grup kontrolnych (Tab. 7).

Tab. 7. Zmiany stężenia podstawowych metabolitów w surowicy krwi młodych i starych szczurów poddanych głodzeniu i następującemu karmieniu *ad libitum*.

Młode szczury	K	G	R2	R4	R6
Mocznik (mg/dl)	24,4 ± 0,9	25,2 ± 0,9	22,8 ± 0,8	21, 5 ± 0,8	19,9 ± 0,6 <sup>a*, b*</sup>
Białko całkow. (g/l)	58,3 ± 0,5	56,3 ± 0,5	56,2 ± 0,7	58,8 ± 1,2	56,5 ± 0,6
Albumina (g/l)	13,6 ± 0,2	13,6 ± 0,3	13,1 ± 0,2	14,2 ± 0,2	12,8 ± 0,4
Glukoza (mmol/l)	18,9 ± 1,3	10,0 ± 1,3 <sup>a**</sup>	18,7 ± 2,5 <sup>b***</sup>	19,5 ± 2,0 <sup>b*</sup>	17,8 ± 1,7
TG (mg/dl)	115,7 ± 11,8	85,6 ± 10,7	100,4 ± 9,1	176,4 ± 14,5 <sup>a*, b**, c**</sup>	140,6 ± 3,7 <sup>b**, c*</sup>
WKT (mmol/l)	0,2 ± 0,03	0,8 ± 0,1 <sup>a***</sup>	0,2 ± 0,03 <sup>b***</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>a**, b*, c**</sup>	0,4 ± 0,04 <sup>a**, b**, c**</sup>
ChC (mg/dl)	71,4 ± 2,2	76 ± 3,9	56,3 ± 2,1 <sup>b*</sup>	70,8 ± 4,6	66,8 ± 1,9
Ch - HDL (mg/dl)	47,4 ± 1,7	40,5 ± 1,9	39,3 ± 2,1	43,8 ± 2,2	42,3 ± 1,7

Stare szczury	K	G	R2	R4	R6
Mocznik (mg/dl)	18,9 ± 0,42 <sup>A***</sup>	17,6 ± 1,1 <sup>A***</sup>	18,5 ± 0,6 <sup>A**</sup>	16,9 ± 0,7 <sup>A**</sup>	20,2 ± 1,5
Białko całkow. (g/l)	61 ± 0,6 <sup>A**</sup>	61 ± 0,5 <sup>A***</sup>	60,1 ± 1,1 <sup>A*</sup>	57,6 ± 0,9	59,8 ± 2,2
Albumina (g/l)	12 ± 0,3 <sup>A***</sup>	12,4 ± 0,3 <sup>A*</sup>	12,2 ± 0,3	12,4 ± 0,5 <sup>A*</sup>	12 ± 0,8
Glukoza (mmol/l)	18,9 ± 1,1	9,6 ± 1,6 <sup>a**</sup>	13,9 ± 2,1 <sup>A*</sup>	16,9 ± 1,3	12,0 ± 4,8
TG (mg/dl)	189,7 ± 20,03 <sup>A**</sup>	174,3 ± 30,3 <sup>A*</sup>	212,5 ± 19,6 <sup>A**</sup>	216,7 ± 17,4	315 ± 25,1 <sup>a*, d*, A*</sup>
WKT (mmol/l)	0,4 ± 0,1 <sup>A**</sup>	0,5 ± 0,1 <sup>A*</sup>	0,2 ± 0,04 <sup>a**, b**</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>c*</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>a**, b*, d*, A*</sup>
ChC (mg/dl)	110,4 ± 5,1 <sup>A***</sup>	129,9 ± 8,5 <sup>A***</sup>	107,9 ± 6,5 <sup>A***</sup>	97,5 ± 5,4 <sup>A*</sup>	115,8 ± 13,3 <sup>A*</sup>
Ch - HDL (mg/dl)	61,2 ± 4,3 <sup>A**</sup>	63,3 ± 3,9 <sup>A***</sup>	67,4 ± 7,1 <sup>A*</sup>	61,3 ± 2,9 <sup>A**</sup>	63,7 ± 10,2 <sup>A*</sup>

Wartości przedstawiają średnią ± SE. Oznaczenia: TG- triacyloglicerole, WKT- wolne kwasy tłuszczowe, ChC- cholesterol całkowity, Ch-HDL- cholesterol frakcji HDL. Liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

## 5.2. Charakterystyka zwierząt w modelu diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia *ad libitum*

### 5.2.1 Zmiany masy ciała zwierząt

Średnia masa ciała starych szczurów ze wszystkich grup doświadczalnych była przeciętnie o 26% wyższa niż u młodych zwierząt (Tab. 8a). 30-dniowa dieta restrykcyjna

spowodowała zmniejszenie masy ciała młodych i starych szczurów o odpowiednio 6% i 11% w porównaniu do grup kontrolnych. Wprowadzenie diety pełnej przywróciło wyjściową masę ciała młodych zwierząt już po dwóch dniach karmienia dietą pełną. Stare szczury nie odzyskały wagi zwierząt kontrolnych nawet po sześciu dniach karmienia *ad libitum* (Tab. 8a).

Tab. 8a. Zmiany masy ciała szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i przywróceniu karmienia *ad libitum*, mierzone w odniesieniu do masy początkowej – górny wiersz oraz w stosunku do masy tych samych zwierząt po diecie restrykcyjnej – dolny wiersz.

	Zmiana masy ciała szczurów (%) ± SE				
	K (g)	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
<b>Młode szczury</b>	352,3 ± 4,0	-6,1 ± 0,5 <sup>a***</sup>	1,3 ± 0,8	1,3 ± 1,1	8,5 ± 1,6 <sup>a**</sup>
			-----	-----	-----
<b>Stare szczury</b>	525,7 ± 6,9 <sup>A***</sup>	-10,9 ± 0,4 <sup>a***A***</sup>	-8,3 ± 0,8 <sup>a**A***</sup>	-7,4 ± 0,6 <sup>a**A***</sup>	-6,5 ± 1,2 <sup>A***</sup>
			-----	-----	-----
			3,4 ± 0,7	3,4 ± 0,5	3,7 ± 0,5

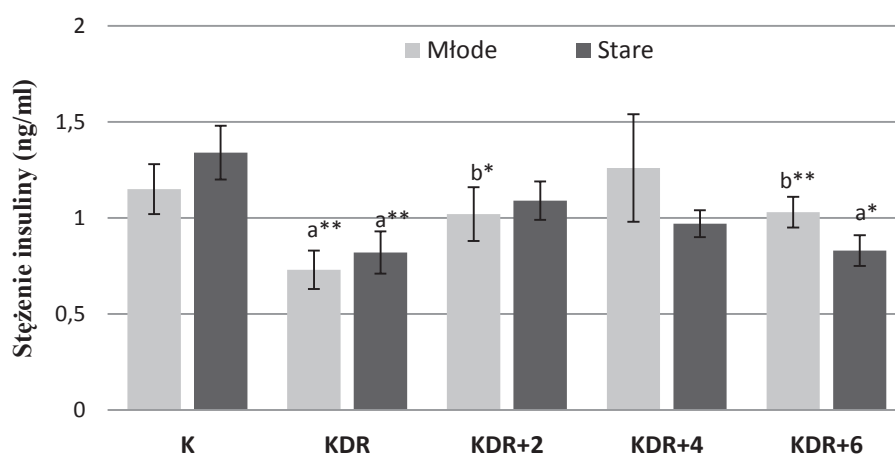
Tab. 8b. Liczebność szczurów w poszczególnych grupach doświadczalnych, otrzymana w dwóch identycznych eksperymentach.

	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
<b>Młode szczury</b>					
<b>1 doświadczenie - N</b> (S, MSM)	11	10	8	8	8
<b>2 doświadczenie - N</b> (S,SOL,EDL)	5	11	6	6	5
<b>Stare szczury</b>					
<b>1 doświadczenie - N</b> (S, MSM)	8	8	8	8	8
<b>2 doświadczenie - N</b> (S,SOL,EDL)	4	6	6	6	4

Wartości przedstawiają średnią wyrażoną w % ± SE. Oznaczenia: K – szczury kontrolne, KDR – zwierzęta poddane 30-dniowej diecie restrykcyjnej 60%, **KDR+2**, **KDR+4**, **KDR+6** – zwierzęta poddane KDR, a następnie karmione *ad libitum* przez wskazaną liczbę dni. W nawiasach podano pobrany materiał badawczy: S- serce, MSM- mięsień szkieletowy mieszany, SOL- m. płaszczkowaty łydki, EDL- m. prostownik palców. Oznaczenia: **a** – wartość znamienne różna względem grupy kontrolnej w danej grupie wiekowej, **b** – wartość znamienne różna względem zwierząt z grupy KDR w danej grupie wiekowej; **c**- wartość znamienne różna względem zwierząt z grupy KDR+2 w danej grupie wiekowej, **d**- wartość znamienne względem zwierząt z grupy KDR+4 w danej grupie wiekowej; **A** – wartość znamienne różna (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) względem grupy młodych zwierząt poddanych tej samej procedurze żywieniowej.

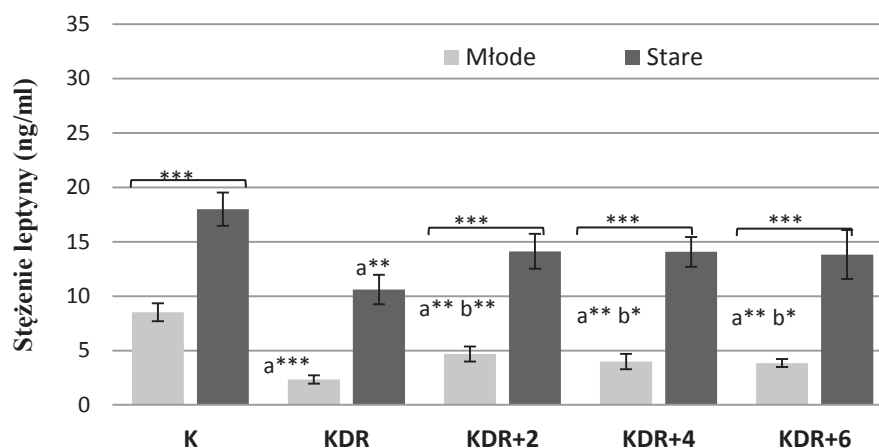
### 5.2.2 Zmiany stężenia insuliny i leptyny w surowicy krwi młodych i starych szczurów

W przebiegu doświadczenia zmiany średniego **stężenia insuliny** w surowicy krwi zachodziły podobnie u młodych i starych szczurów (Ryc. 8). Krótkotrwała dieta restrykcyjna obniżyła średnie stężenie insuliny u młodych i starych zwierząt o odpowiednio 37% i 39% w porównaniu do grupy kontrolnej. Wprowadzenie diety pełnej spowodowało wzrost stężenia insuliny w surowicy krwi młodych szczurów o 40% (względem grupy KDR), przywracając tym samym poziom kontrolny już po dwóch dniach karmienia dietą pełną (Ryc. 8). U starych zwierząt, dwa dni karmienia *ad libitum* zwiększyło stężenie insuliny o 33% (względem grupy KDR), ale nie osiągnęło stężenia szczurów kontrolnych do końca karmienia dietą pełną (Ryc. 8).



Ryc. 8. Stężenie insuliny (ng/ml) w surowicy krwi szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i przywróceniu karmienia *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

Średnie **stężenie leptyny** było istotnie wyższe w surowicy krwi starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt (Ryc. 9). 30-dniowa dieta restrykcyjna obniżyła stężenie hormonu u młodych i starych szczurów o odpowiednio 73% i 42% w porównaniu do grup kontrolnych. Wprowadzenie dwudniowej diety pełnej spowodowało wzrost stężenia leptyny o 100% u młodych zwierząt i 33% u starych, względem grupy KDR (Ryc. 9). Kolejne dni karmienia *ad libitum* nie zmieniły poziomu hormonu u zwierząt z obu grup wiekowych, chociaż u młodych zwierząt stężenie leptyny nie wzrosło do poziomu kontroli do końca okresu karmienia dietą pełną (Ryc. 9).



Ryc. 9. Stężenie leptyny (ng/ml) w surowicy krwi szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i przywróceniu karmienia *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Oznaczenia, liczebności grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

### 5.2.3 Zmiany stężeń wybranych metabolitów w surowicy krwi młodych i starych szczurów

Zmiany stężeń podstawowych metabolitów w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych, poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*, przedstawiono w tabeli 9.

Średnie stężenie mocznika i albuminy było niższe w surowicy krwi starych szczurów kontrolnych niż u młodych zwierząt o odpowiednio 21,8% i 10,7% (Tab. 9). Odwrotną sytuację odnotowano w przypadku stężenia białka całkowitego, które o 5,4% było wyższe u dwuletnich szczurów niż u młodych zwierząt. 30-dniowa dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wpłynęły na stężenia mocznika, albuminy ani białka całkowitego w surowicy krwi młodych i starych szczurów w porównaniu do grup kontrolnych (Tab. 9).

Średnie stężenie glukozy było porównywalne w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych (Tab. 9). Pod wpływem KDR stężenie glukozy obniżyło się u młodych i starych szczurów o odpowiednio 44,6% i 31,9% w porównaniu do grup kontrolnych. U młodych zwierząt, dwa dni karmienia *ad libitum* zwiększyło stężenie glukozy o 56,6% względem grupy KDR, przywracając tym samym stężenie glukozy szczurów kontrolnych (Tab. 9). U starych szczurów dopiero w 6 dniu karmienia dietą pełną stężenie glukozy osiągnęło poziom szczurów kontrolnych (Tab. 9).

Tab. 9. Zmiany stężenia podstawowych metabolitów w surowicy krwi młodych i starych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*.

Młode szczury	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
Mocznik (mg/dl)	23,9 ± 0,8	23,5 ± 0,6	24,3 ± 0,7	24,9 ± 1,2	25,6 ± 0,7
Białko całkowite (g/l)	58,4 ± 0,4	55,9 ± 0,5	55,2 ± 0,7	54,5 ± 1,4 <sup>a**</sup>	54,9 ± 0,7
Albumina (g/l)	13,5 ± 0,2	13 ± 0,3	13,3 ± 0,4	13,1 ± 0,2	13,1 ± 0,3
Glukoza (mmol/l)	18,7 ± 1,1	10,4 ± 0,5 <sup>a***</sup>	15,1 ± 1,4 <sup>b***</sup>	14,7 ± 1,3 <sup>b***</sup>	17,7 ± 1,0 <sup>b***</sup>
TG (mg/dl)	110,4 ± 9,2	57,8 ± 4,3 <sup>a***</sup>	70,3 ± 5,9 <sup>a*</sup>	73,9 ± 6,9 <sup>a*</sup>	95,2 ± 10,9 <sup>b**</sup>
WKT (mmol/l)	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,03 <sup>b*</sup>	0,5 ± 0,1
ChC (mg/dl)	68,7 ± 1,2	73,8 ± 0,7	70,4 ± 4,3	71,3 ± 2,2	76,2 ± 5,2
Ch - HDL (mg/dl)	42,4 ± 2,5	31,1 ± 2,7	41,2 ± 5,2	36,6 ± 3,1	37,2 ± 3,7

Stare szczury	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
Mocznik (mg/dl)	18,7 ± 0,4 <sup>A***</sup>	17,5 ± 1,2 <sup>A***</sup>	19,6 ± 0,9 <sup>A**</sup>	18,9 ± 0,6 <sup>A***</sup>	21,2 ± 0,8 <sup>A**</sup>
Białko całkowite (g/l)	61,5 ± 0,7 <sup>A***</sup>	60,1 ± 1,1 <sup>A***</sup>	57,8 ± 1,2	60 ± 0,8 <sup>A***</sup>	59 ± 1,03 <sup>A**</sup>
Albumina (g/l)	12,1 ± 0,3 <sup>A***</sup>	12,1 ± 0,4	12 ± 0,7	11,8 ± 0,3 <sup>A**</sup>	11,8 ± 0,4 <sup>A*</sup>
Glukoza (mmol/l)	17,8 ± 1,3	12,1 ± 1,0 <sup>a**</sup>	9,8 ± 1,6 <sup>a**, A*</sup>	9,8 ± 0,9 <sup>a***, A***</sup>	14,7 ± 1,3 <sup>d*</sup>
TG (mg/dl)	189,5 ± 17,9 <sup>A***</sup>	72,5 ± 9,2 <sup>a***</sup>	111,5 ± 14,4 <sup>a**, b**, A*</sup>	120,4 ± 15,9 <sup>a**, b*, A*</sup>	165,9 ± 18,9 <sup>b***, c*, A*</sup>
WKT (mmol/l)	0,4 ± 0,1 <sup>A**</sup>	0,6 ± 0,1 <sup>a*, A**</sup>	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1 <sup>A**</sup>	0,8 ± 0,1 <sup>A*</sup>
ChC (mg/dl)	114,4 ± 5,9 <sup>A***</sup>	122,1 ± 6,5 <sup>A***</sup>	113,9 ± 7,1 <sup>A***</sup>	128,1 ± 8,2 <sup>A***</sup>	111,8 ± 7,0 <sup>A**</sup>
Ch - HDL (mg/dl)	58 ± 4,3 <sup>A**</sup>	40,2 ± 4,2 <sup>A*</sup>	39,1 ± 3,2	40,4 ± 3,5	47 ± 4,5

Wartości przedstawiają średnią ± SE. Oznaczenia: TG- triacyloglicerole, WKT- wolne kwasy tłuszczowe, ChC- cholesterol całkowity, Ch-HDL- cholesterol frakcji HDL; **a** – wartość znamienne różna względem grupy kontrolnej w danej grupie wiekowej, **b** – wartość znamienne różna względem grupy zwierząt KDR w danej grupie wiekowej; **c**- wartość znamienne różna względem zwierząt z grupy KDR+2 w danej grupie wiekowej, **d**- wartość znamienne różna względem zwierząt z grupy KDR+4 w danej grupie wiekowej; **A** – wartość znamienne różna (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) względem grupy młodych zwierząt poddanych tej samej procedurze żywieniowej. Liczebność grup - jak dla Tab. 8.

Średnie stężenie TG w surowicy krwi starych szczurów kontrolnych było o 64% wyższe niż u młodych zwierząt (Tab. 9). KDR obniżyła stężenie triacylogliceroli u

młodych i dwuletnich szczurów o odpowiednio 47,6% i 61,7%. U obu grup wiekowych przywrócenie diety pełnej przez dwa dni spowodowało wzrost stężenie TG o 21,6% i 53,7% względem grupy KDR, natomiast powrót do poziomu podstawowego nastąpił dopiero w 6 dniu karmienia dietą pełną (Tab. 9).

Średnie **stężenie WKT** było dwukrotnie wyższe w surowicy krwi starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt (Tab. 9). 30-dniowa dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie miały wpływu na stężenie WKT u młodych zwierząt, z wyjątkiem ponad 2-krotnego obniżenia względem grupy KDR w 4 dniu karmienia dietą pełną. U starych szczurów, dieta restrykcyjna spowodowała wzrost stężenia WKT o 48,7% w porównaniu do grupy kontrolnej i jego obniżenie do poziomu podstawowego w czasie karmienia dietą pełną (Tab. 9).

Średnie stężenie **cholesterolu całkowitego (ChC)** oraz **cholesterolu-HDL (Ch-HDL)** było o ponad 65% i 35% wyższe w surowicy krwi starych szczurów niż u młodych zwierząt na każdym etapie doświadczenia (Tab. 9). KDR oraz karmienie dietą pełną nie miało wpływu na średnie stężenie ChC i Ch-HDL u szczurów z obu grup wiekowych.

### **5.3. Ekspresja genów i białek sirtuin w sercu oraz mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych-karmionych**

#### **5.3.1 Ekspresja *Sirt1* na poziomie mRNA**

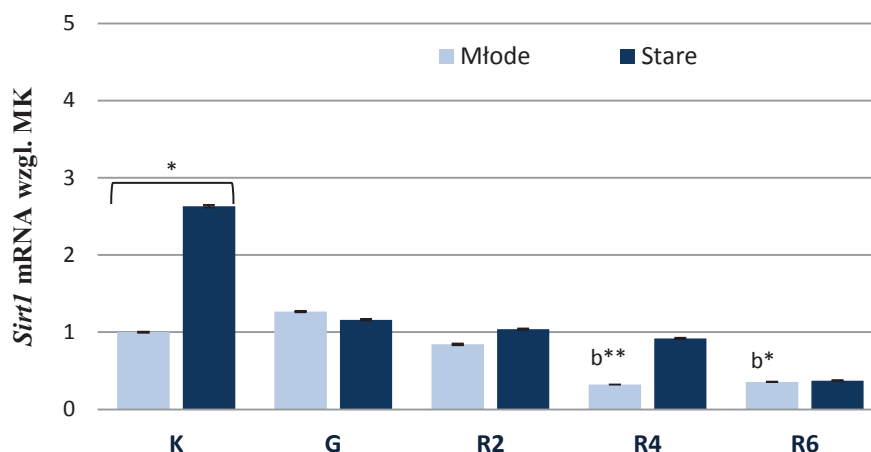
Pomimo licznych prób z wykorzystaniem dwóch rodzajów przeciwciał I-rzędowych anti-SIRT1 (pochodzących od różnych gatunków) oraz przetestowania wielu możliwości rozcieńczeń, nie udało się wykonać pomiaru względnej ilości białka sirtuiny 1 w mięśniach szczurów głodzonych - karmionych. Przedstawione wyniki dotyczą pomiaru ekspresji *Sirt1* na poziomie mRNA.

##### *5.3.1.1 Mięsień sercowy*

Głodzenie oraz 2-dniowe karmienie dietą pełną nie wywołało istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Sirt1* w **sercu młodych** szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej. Jedynie w 4 i 6 dniu od wprowadzenia diety pełnej odnotowano 4-krotne obniżenie poziomu mRNA *Sirt1* względem grupy głodzonej (Ryc. 10).

**W sercu starych** szczurów kontrolnych ekspresja genu *Sirt1* była istotnie wyższa niż u młodych zwierząt. Głodzenie oraz karmienie *ad libitum* nie wywołało istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Sirt1* w porównaniu do grupy kontrolnej. Pomimo to,

zaobserwowano, że poziom mRNA *Sirt1* w sercach starych szczurów z grup G i R2-6 był niższy od poziomu kontrolnego (Ryc. 10).

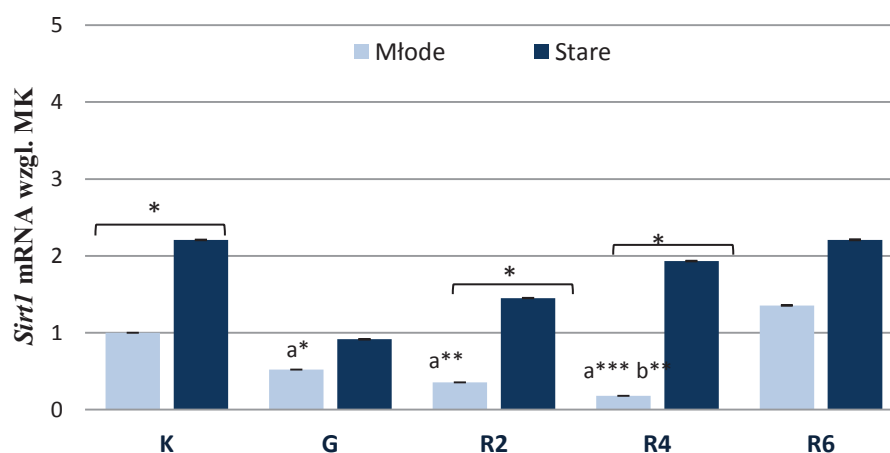


Ryc. 10. Ekspresja genu *Sirt1* w sercu szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

W mięśniu sercowym młodych i starych szczurów poddanych dwudniowemu głodzeniu ekspresja genu *Sirt1* była silnie skorelowana z ekspresją: *Sirt3* ( $r= 0.75$ ,  $p= 0,02$ ), *Cpt-1* ( $r= 0.77$ ,  $p= 0,016$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.86$ ,  $p= 0,014$ ).

### 5.3.1.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W mięśniu szkieletowym mieszanym młodych szczurów głodzenie oraz 2 i 4-dniowe karmienie dietą pełną spowodowały kolejno 2, 3 i 4- krotne zmniejszenie ekspresji genu *Sirt1* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 11). Dopiero w 6 dniu karmienia *ad libitum* poziom mRNA *Sirt1* wrócił do poziomu kontrolnego (Ryc. 11).



Ryc. 11. Ekspresja genu *Sirt1* w mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.



**W MSM starych** szczurów kontrolnych ekspresja genu *Sirt1* była istotnie wyższa niż u młodych zwierząt. Głodzenie natomiast ponad 2-krotnie obniżyło ekspresję genu *Sirt1* w porównaniu do grupy kontrolnej, choć wynik ten nie był znamieny statystycznie. Karmienie *ad libitum* przywróciło poziom podstawowy mRNA *Sirt1* (Ryc. 11).

W **MSM młodych** szczurów poddanych dwudniowemu głodzeniu ekspresja genu *Sirt1* była silnie skorelowana z ekspresją: *Sirt7* ( $r= 0.9$ ,  $p= 0,002$ ), *Cpt-I* ( $r= 0.77$ ,  $p= 0,016$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.86$ ,  $p= 0,014$ ), natomiast u **starych** zwierząt ekspresja genu *Sirt1* korelowała jedynie z ekspresją *Sirt7* ( $r= 0.9$ ,  $p= 0,002$ ).

### 5.3.2 Ekspresja sirtuiny 3 na poziomie mRNA i białka

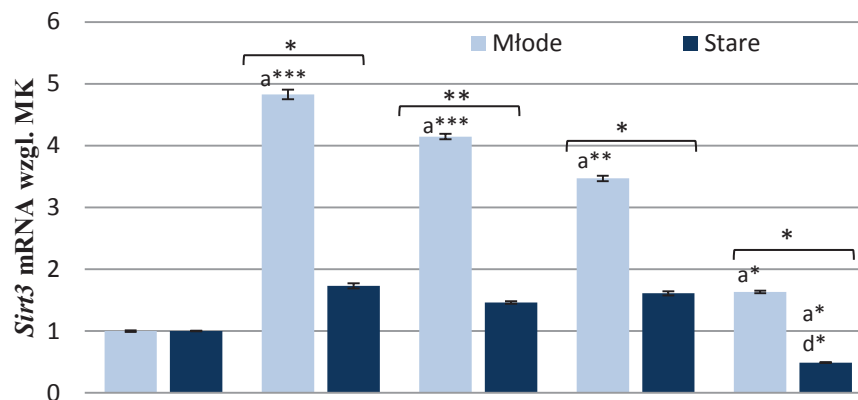
#### 5.3.2.1 Mięsień sercowy

W wyniku 2-dniowego głodzenia nastąpił prawie 5-krotny wzrost ekspresji genu *Sirt3* w **sercu młodych** szczurów, który stopniowo ulegał obniżeniu po wprowadzeniu diety pełnej, ale utrzymując się powyżej poziomu kontrolnego do 6 dnia karmienia *ad libitum* (Ryc. 12).

W sercu młodych szczurów głodzenie wywołało także 20% wzrost ekspresji sirtuiny 3 na poziomie białka (Ryc. 12). Jednak po wprowadzeniu diety pełnej, ekspresja SIRT3 obniżyła się o 24% względem kontroli i utrzymała się poniżej poziomu podstawowego do końca karmienia dietą pełną (Ryc. 12).

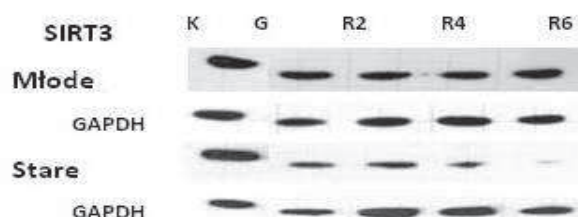
**W mięśniu sercowym starych** szczurów, głodzenie oraz 2 i 4-dniowe karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Sirt3* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 12). Z kolei w tych samych grupach doświadczalnych, ekspresja SIRT3 na poziomie białka w sercu starych szczurów była o około 70% niższa w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Ryc. 13). Po 6 dniach diety pełnej zanotowano 2-krotne obniżenie ekspresji genu oraz obniżenie o 80% poziomu SIRT3 w stosunku do poziomu podstawowego szczurów kontrolnych (Ryc. 12, Ryc. 13).

W **mięśniu sercowym młodych i starych** szczurów poddanych dwudniowemu głodzeniu ekspresja genu *Sirt3* była silnie skorelowana z ekspresją: *Sirt1* ( $r= 0.75$ ,  $p= 0,02$ ), *Sirt7* ( $r= 0.88$ ,  $p= 0,0008$ ), *Cpt-I* ( $r= 0.81$ ,  $p= 0,004$ ), *Pgc-1 $\alpha$*  ( $r= 0.81$ ,  $p= 0,015$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.89$ ,  $p= 0,007$ ).



Ryc. 12. Ekspresja genu *Sirt3* w sercu szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

SIRT3 (S)	K	G	R2	R4	R6
Młode	1.00	1.20	0.76	0.61	0.87
Stare	1.00	0.34	0.27	0.30	0.16



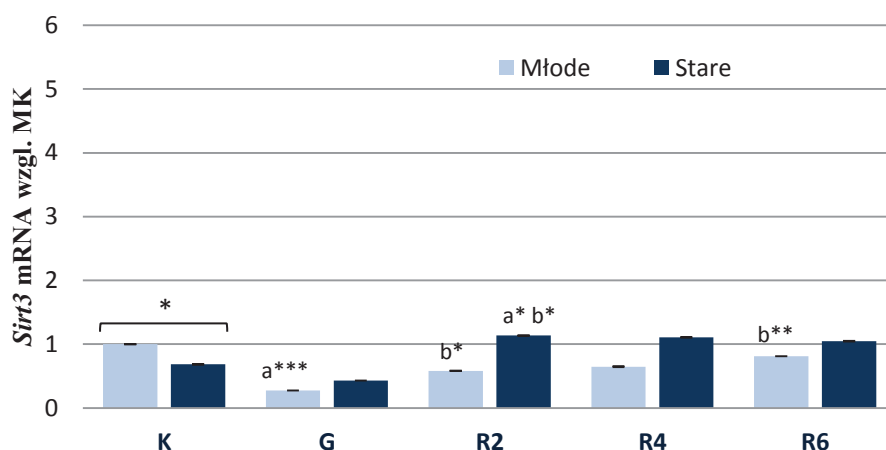
Ryc. 13. Ekspresja białka SIRT3 w sercu (S) szczurów głodzonych -karmionych. Dół: ekspresja SIRT3 w sercu młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka referencyjnego GAPDH (średnia z 2 prób). Wartości normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych. Liczebność grup, n= 2. Oznaczenia grup - jak dla Tab. 6.

### 5.3.2.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W mięśniu szkieletowym mieszanym ekspresja genu *Sirt3* była o 32% wyższa u kontrolnych młodych szczurów niż u starych zwierząt, co potwierdzono także na poziomie białka SIRT3 (Ryc. 14, Ryc. 15). Dwudniowe głodzenie spowodowało ponad 3-krotne obniżenie ekspresji mRNA *Sirt3* w MSM młodych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei wprowadzenie diety pełnej przywróciło poziom mRNA sirtuiny 3 charakterystyczny dla szczurów kontrolnych (Ryc. 14).

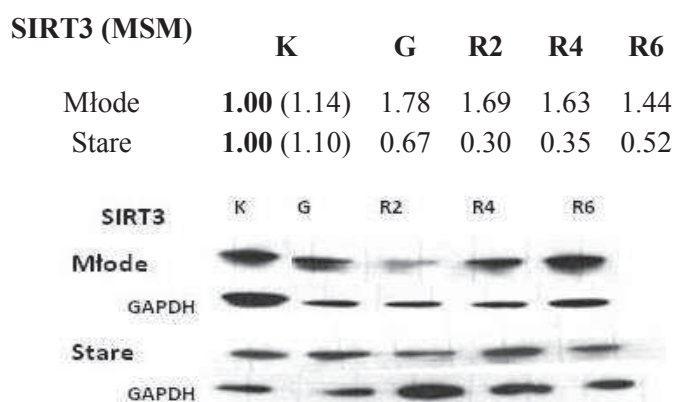
W MSM starych szczurów, głodzenie obniżyło ekspresję genu *Sirt3* w porównaniu do grupy kontrolnej, choć różnica ta była na progu znamienności statystycznej (Ryc. 14). Przywrócenie karmienia *ad libitum* spowodowało prawie 2-krotny wzrost mRNA *Sirt3*

względem grupy kontrolnej oraz 3-krotny względem grupy głodzonej. Stan ten utrzymał się do końca karmienia dietą pełną (Ryc. 14).



Ryc. 14. Ekspresja genu *Sirt3* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

Odmianą sytuację zanotowano w przypadku ekspresji białka SIRT3 w mięśni szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów (Ryc. 15). U młodych zwierząt głodzenie oraz 2, 4 i 6- dniowe karmienie dietą pełną spowodowały wzrost poziomu SIRT3, o odpowiednio 78%, 69%, 63% i 44% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 15). W mięśni szkieletowym starych szczurów, głodzenie obniżyło ekspresję białka SIRT3 o 33% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 15). W następującym karmieniu *ad libitum* zanotowano 65-70% obniżenie zawartości SIRT3 w porównaniu do kontroli. W 6 dniu karmienia dietą pełną, poziom białka SIRT3 wzrósł względem grup R2 i R4, ale pozostał na poziomie ponad 50% niższym od poziomu kontrolnego (Ryc. 15).



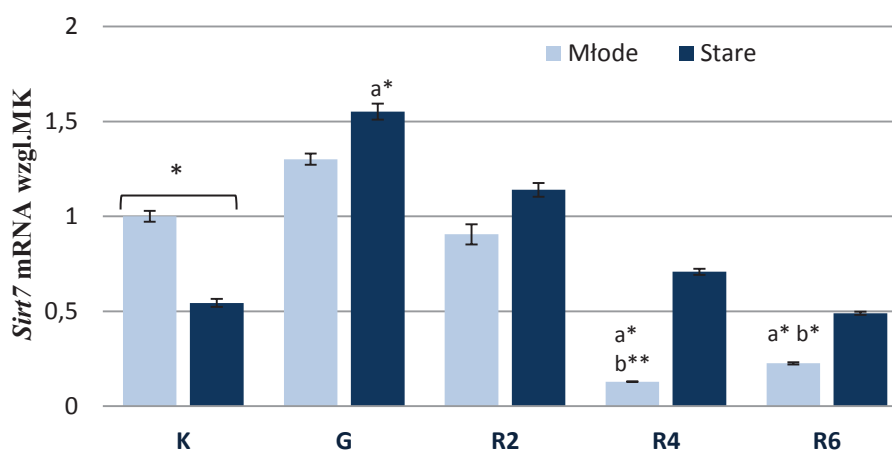
Ryc. 15. Ekspresja białka SIRT3 w mięśni szkieletowym mieszanym (MSM) szczurów głodzonych – karmionych. Dół: ekspresja SIRT3 w mięśni szkieletowym młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych. Oznaczenia grup - jak dla Tab. 6.

### 5.3.3 Ekspresja sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka

#### 5.3.3.1 Mięsień sercowy

Ekspresja genu *Sirt7* w **sercu młodych kontrolnych** szczurów była prawie 2-krotnie wyższa niż u starych zwierząt, co potwierdzono także na poziomie białka SIRT7 (Ryc. 16, Ryc. 17).

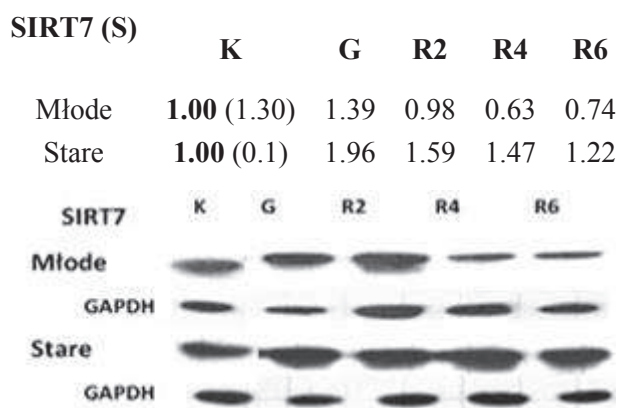
Pod wpływem głodzenia w **mięśniu sercowym młodych** szczurów ekspresja sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka wzrosła o odpowiednio 30% i 40% względem grupy kontrolnej (Ryc. 16, Ryc. 17). Dwudniowe karmienie dietą pełną przywróciło poziom podstawowy ekspresji sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka (Ryc. 16, Ryc. 17). Jednak kolejne 4 i 6 dni karmienia *ad libitum* obniżyło, w sercu młodych zwierząt, prawie 3-krotnie poziom mRNA *Sirt7* oraz o 25-35% względny poziom białka SIRT7 w odniesieniu do grupy kontrolnej (Ryc. 16, Ryc. 17).



Ryc. 16. Ekspresja genu *Sirt7* w sercu szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

**W sercu starych** szczurów 48-godzinne głodzenie wywołało prawie 2-krotny wzrost poziomu mRNA i białka sirtuiny 7 w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 16, Ryc. 17). Następujące karmienie dietą pełną spowodowało stopniowe obniżenie poziomu mRNA *Sirt7* do osiągnięcia poziomu podstawowego w 6 dniu karmienia dietą pełną (Ryc. 16), co obserwowano także na poziomie białka SIRT7 w sercu starych szczurów karmionych dietą pełną. Jednak w 6 dniu karmienia *ad libitum* ekspresja SIRT7 pozostała powyżej poziomu grupy kontrolnej (Ryc. 17).

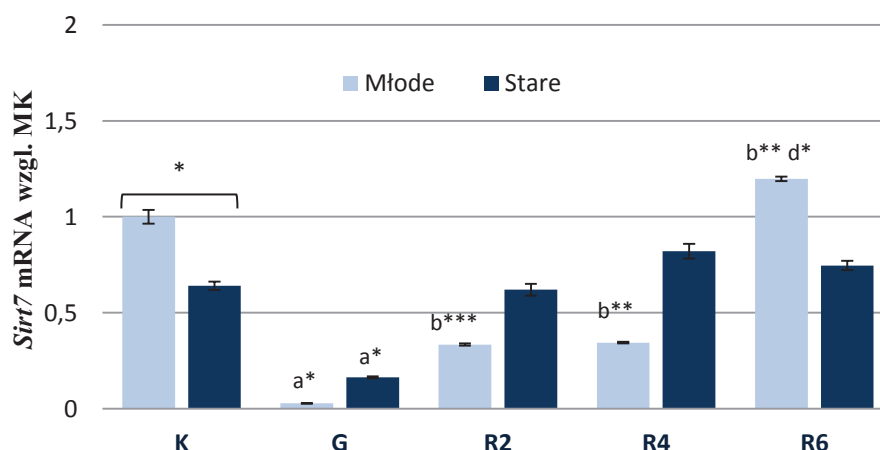
W mięśni sercowym młodych i starych szczurów poddanych dwudniowemu głodzeniu ekspresja genu *Sirt7* była skorelowana z ekspresją: *Sirt3* ( $r= 0.88$ ,  $p= 0,0008$ ), *Cpt-1* ( $r= 0.69$ ,  $p= 0,004$ ), *Pgc-1 $\alpha$*  ( $r= 0.76$ ,  $p= 0,028$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.86$ ,  $p= 0,014$ ).



Ryc. 17. Ekspresja białka SIRT7 w sercu (S) szczurów głodzonych –karmionych. Dół: ekspresja SIRT3 w mięśni szkieletowym młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych (wartość wyjściowa). Oznaczenia grup - jak dla Tab. 6.

### 5.3.3.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

Ekspresja genu *Sirt7* w mięśni szkieletowym mieszanym młodych kontrolnych szczurów była o 36% wyższa niż u starych zwierząt (Ryc. 18). Dwudniowe głodzenie spowodowało ponad 333-krotne u młodych i 4-krotne u starych szczurów obniżenie poziomu mRNA *Sirt7* w porównaniu do grupy kontrolnej. Zmniejszenie ekspresji sirtuiny 7 w MSM szczurów głodzonych z obu grup wiekowych zaobserwowano także na poziomie białka (Ryc. 19).

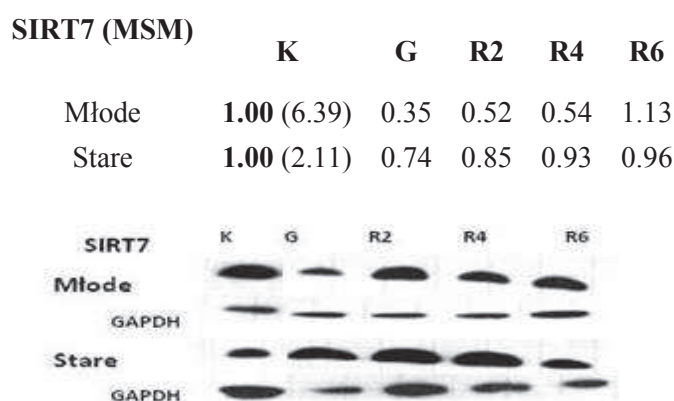


Ryc. 18. Ekspresja genu *Sirt7* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

Przywrócenie diety pełnej ponad 10-krotnie zwiększyło ekspresję genu *Sirt7* w MSM młodych szczurów, dorównując do poziomu podstawowego w 6 dniu karmienia dietą pełną (Ryc. 18). Podobny efekt zaobserwowano na poziomie białka (Ryc. 19).

U **starych szczurów**, ekspresja sirtuiny 7 wróciła do poziomu podstawowego szczurów kontrolnych na poziomie mRNA już w drugim dniu karmienia *ad libitum* oraz w 4 dniu na poziomie białka (Ryc. 18, Ryc. 19).

W **mięśniu szkieletowym młodych i starych** szczurów poddanych dwudniowemu głodzeniu, ekspresja genu *Sirt7* była pozytywnie skorelowana jedynie z ekspresją *Sirt1* ( $r=0.9$ ,  $p=0,002$ ).



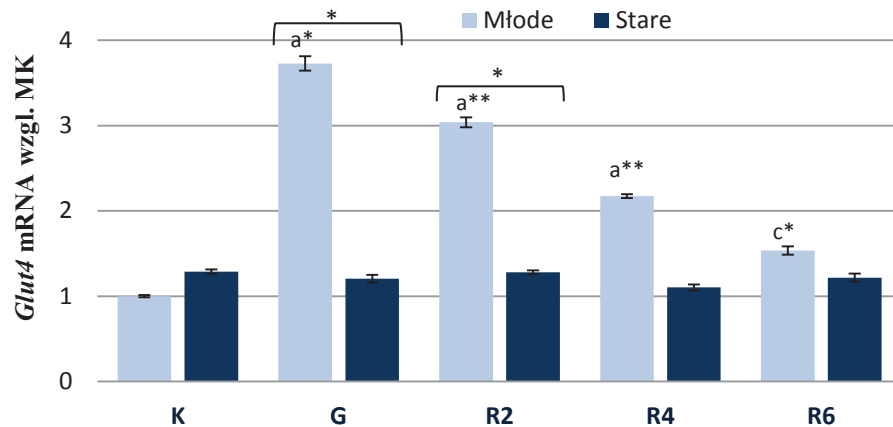
Ryc. 19. Ekspresja białka SIRT7 w mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych – karmionych. Dół: ekspresja SIRT7 w mięśniu szkieletowym młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych (wartość wyjściowa). Oznaczenia grup - jak dla Tab. 6..

#### 5.4. Ekspresja genów *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta$* w sercu oraz mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych-karmionych

##### 5.4.1 Ekspresja *Glut4* na poziomie mRNA

###### 5.4.1.1 Mięsień sercowy

Dwudniowe głodzenie spowodowało prawie 4-krotny wzrost ekspresji genu *Glut4* w **sercu młodych** szczurów, który stopniowo obniżając się po wprowadzeniu diety pełnej, osiągnął poziom ekspresji szczurów kontrolnych w 6 dniu karmienia *ad libitum* (Ryc. 20). W **mięśniu sercowym starych** szczurów, głodzenie oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Glut4* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 20).



Ryc. 20. Ekspresja genu *Glut4* w sercu szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

#### 5.4.1.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

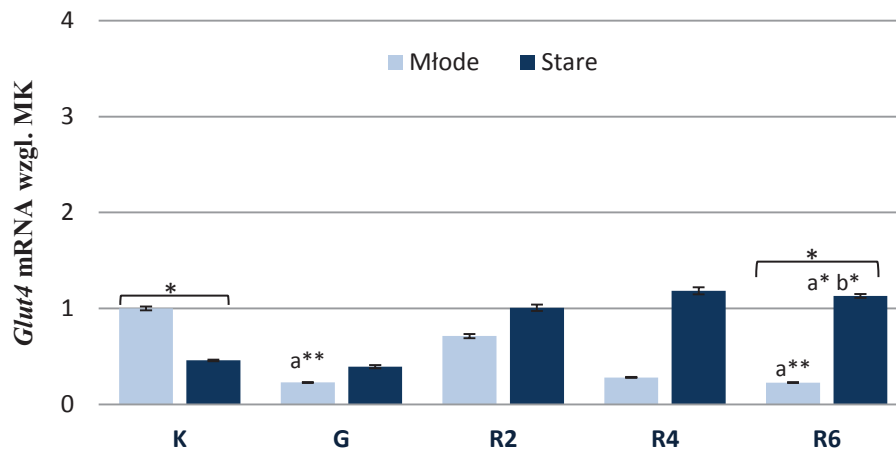
W **mięśniu szkieletowym mieszanym** ekspresja genu *Glut4* była ponad 2-krotnie wyższa u młodych kontrolnych szczurów niż u starych zwierząt (Ryc. 21). Dwa dni głodzenia spowodowało prawie 5-krotne obniżenie ekspresji mRNA transportera glukozy w MSM młodych szczurów i pozostało poniżej poziomu podstawowego przez 6 dni karmienia dietą pełną (Ryc. 21).

W **MSM starych** szczurów, głodzenie przez 48 godzin nie wywołało istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Glut4* w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 21). Z kolei, przywrócenie karmienia *ad libitum* przez 2, 4 i 6 dni spowodowało prawie 3-krotny wzrost poziomu mRNA *Glut4* u starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 21).

### 5.4.2 Ekspresja *Pgc-1 $\alpha$* na poziomie mRNA

#### 5.4.2.1 Mięsień sercowy

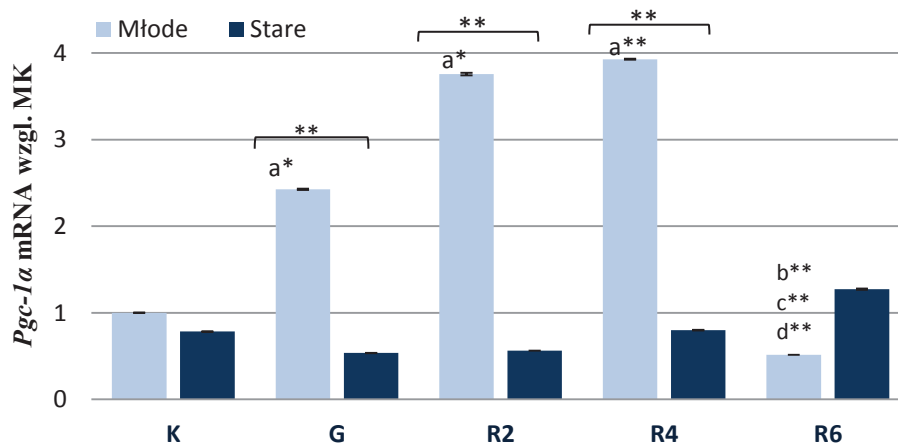
W **sercu młodych** szczurów, dwa dni głodzenia wywołało prawie 2,5- krotny wzrost poziomu mRNA *Pgc-1 $\alpha$* , który po przywróceniu diety pełnej w 2 i 4 dniu osiągnął poziom prawie 4-krotnie wyższy niż poziom podstawowy (Ryc. 22). W 6 dniu karmienia *ad libitum* ekspresja genu koaktywatora była na poziomie młodych szczurów kontrolnych.



**Ryc. 21. Ekspresja genu *Glut4* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych.** Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

W **mięśniu sercowym starych** szczurów, głodzenie oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji genu *Pgc-1 $\alpha$*  w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 22).

W **mięśniu sercowym młodych i starych** szczurów poddanych dwudniowemu głodzeniu, ekspresja genu *Pgc-1 $\alpha$*  była silnie skorelowana z ekspresją *Sirt3* ( $r= 0.81$ ,  $p= 0,015$ ), *Cpt-1* ( $r= 0.9$ ,  $p= 0,002$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.9$ ,  $p= 0,037$ ).

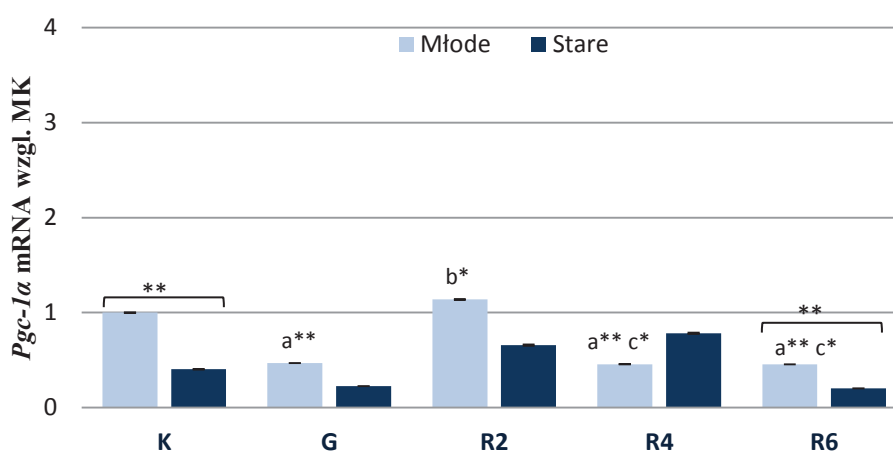


**Ryc. 22. Ekspresja genu *Pgc-1 $\alpha$*  w sercu szczurów głodzonych - karmionych.** Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.



#### 5.4.2.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W mięśni szkieletowym mieszanym ekspresja genu *Pgc-1 $\alpha$*  była ponad 2-krotnie wyższa u młodych kontrolnych szczurów niż u starych zwierząt (Ryc. 23). Dwa dni głodzenia spowodowało ponad 2-krotne obniżenie poziomu mRNA koaktywatora w **mięśniu młodych** szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej. Wprowadzenie dwudniowej diety pełnej, przywróciło poziom podstawowy ekspresji genu *Pgc-1 $\alpha$* , z kolei w 4 i 6 dniu karmienia dietą pełną poziom ten ponownie obniżył się ponad 2-krotnie w stosunku do szczurów kontrolnych (Ryc. 23).



Ryc. 23. Ekspresja genu *Pgc-1 $\alpha$*  w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

W **MSM starych** szczurów pod wpływem głodzenia i następującego karmienia dietą pełną doszło do nieznamiennych statystycznie wahań w ekspresji genu *Pgc-1 $\alpha$*  względem kontroli (Ryc. 23).

W **MSM młodych** i **starych** szczurów poddanych dwudniowemu głodzeniu, zaobserwowano pozytywną korelację między ekspresją genu *Pgc-1 $\alpha$*  a ekspresją *Ppar- $\beta$*  ( $r=0.86$ ,  $p=0.014$ ).

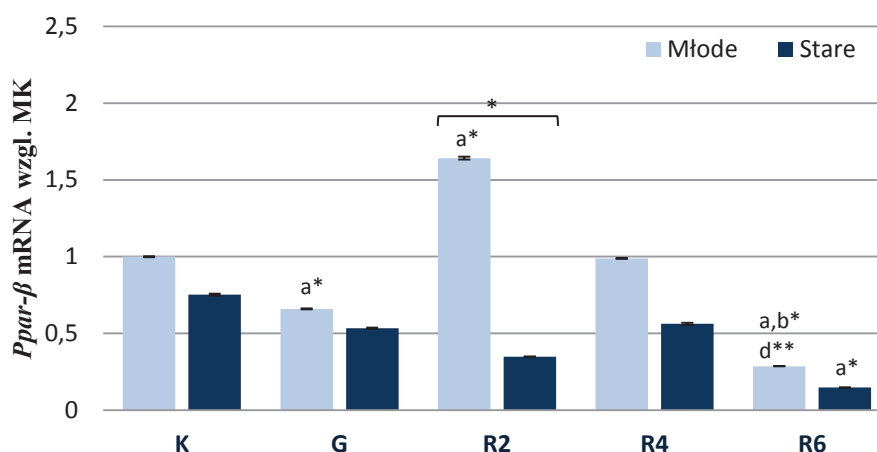
### 5.4.3 Ekspresja *Ppar- $\beta$* na poziomie mRNA

#### 5.4.3.1 Mięsień sercowy

W **sercu młodych** szczurów dwa dni głodzenia spowodowało 34% obniżenie ekspresji genu receptora *Ppar- $\beta$*  w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 24).

Przywrócenie karmienia *ad libitum* przez 2 dni podwyższyło poziom mRNA receptora o 64%, w 4 dniu wrócił on do poziomu podstawowego, natomiast w 6 dniu ponownie obniżył się ponad 3-krotnie względem młodych szczurów kontrolnych.

W **mięśniu sercowym starych** szczurów, podczas głodzenia oraz karmienia dietą pełną przez 2 i 4 dni zaobserwowano tendencję do powolnego obniżenia się ekspresji genu *Ppar-β*, która osiągnęła w 6 dniu poziom 5-krotnie niższy w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 24).



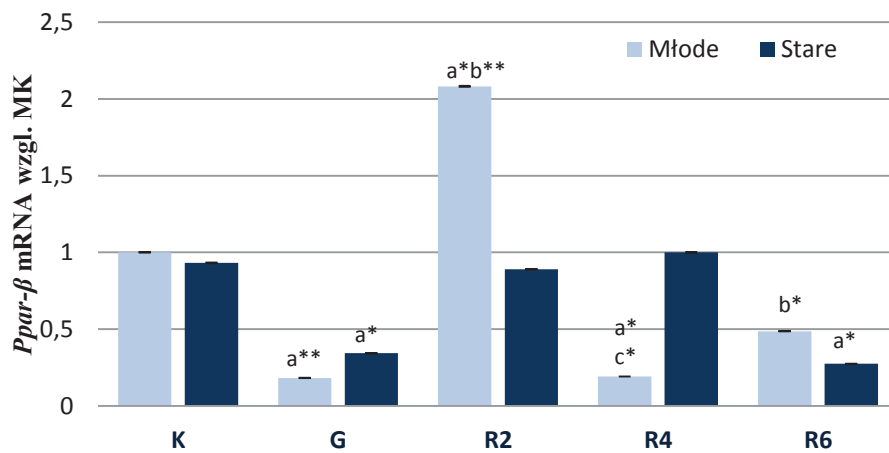
Ryc. 24. Ekspresja genu *Ppar-β* w sercu szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią ± SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

#### 5.4.3.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W **mięśniu szkieletowym mieszanym młodych** szczurów, dwa dni głodzenia wywołało 5-krotne zmniejszenie ekspresji genu receptora *Ppar-β* w porównaniu do kontroli (Ryc. 25). Następujące karmienie *ad libitum* przez 2 dni podwyższyło poziom mRNA *Ppar-β* w MSM prawie 12-krotnie względem młodych szczurów głodzonych oraz ponad 2-krotnie w stosunku do poziomu podstawowego (Ryc. 25). W 4 dniu karmienia dietą pełną poziom ekspresji genu receptora w mięśniu ponownie obniżył się 5-krotnie względem grupy kontrolnej oraz 11-krotnie względem szczurów z grupy R2. W 6 dniu karmienia *ad libitum* ekspresja genu *Ppar-β* w MSM podwyższyła się ponad 2,5-krotnie względem szczurów głodzonych, pozostając jednak poniżej poziomu podstawowego (brak istotności statystycznej,  $p=0,12$ ).

W **MSM starych** szczurów, głodzenie przez 48 godzin prawie 3-krotnie obniżyło ekspresję genu *Ppar-β* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 25). Wprowadzenie diety pełnej przez 2 i 4 dni przywróciło poziom podstawowy ekspresji genu. W 6 dniu karmienia

*ad libitum* ekspresja mRNA *Ppar-β* ponownie obniżyła się, osiągając poziom ponad 3,5-krotnie niższy względem grupy kontrolnej (Ryc. 25).



Ryc. 25. Ekspresja genu *Ppar-β* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych - karmionych. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 6.

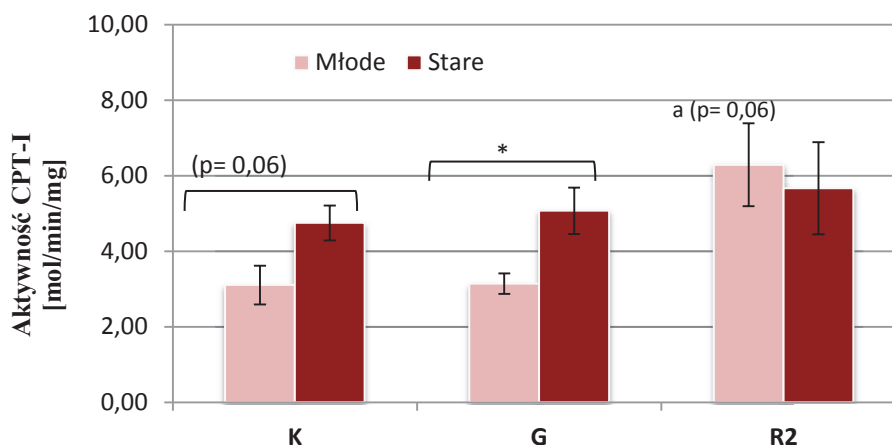
## 5.5. Aktywność i ekspresja palmitoilotransferazy karnitynowej I w sercu i mięśni szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych, a następnie karmionych *ad libitum* przez dwa dni

### 5.5.1 Aktywność CPT-I

#### 5.5.1.1 Mięsień sercowy

W sercu młodych szczurów, głodzenie przez 48 godzin nie wywołało istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 26). Z kolei przywrócenie diety pełnej ponad 2-krotnie zwiększyło aktywność enzymu w porównaniu do kontroli (Ryc. 26).

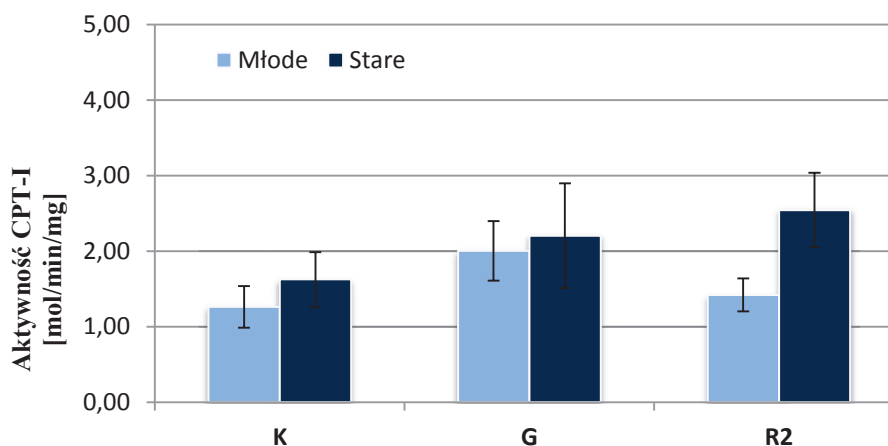
W mięśni sercowym starych szczurów, głodzenie oraz następujące karmienie *ad libitum* nie wywołały istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 26). Jednak poziom aktywności enzymu u starych szczurów kontrolnych i głodzonych był o odpowiednio 54% i 62% wyższy niż u młodych zwierząt poddanych tej samej procedurze doświadczalnej (Ryc. 26).



Ryc. 26. Aktywność CPT-I [mol/min/mg] w mięśniu sercowym szczurów poddanych głodzeniu i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Liczebność szczurów w grupach doświadczalnych, n= 5; a – wartość znamienne różna względem grupy K w danej grupie wiekowej, b – wartość znamienne różna względem grupy zwierząt G w danej grupie wiekowej. Oznaczenia grup oraz znamienność statystyczna - jak w Tab. 6.

#### 5.5.1.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W mięśniu szkieletowym młodych i starych szczurów, głodzenie oraz następujące karmienie dietą pełną nie wywołało istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 27).



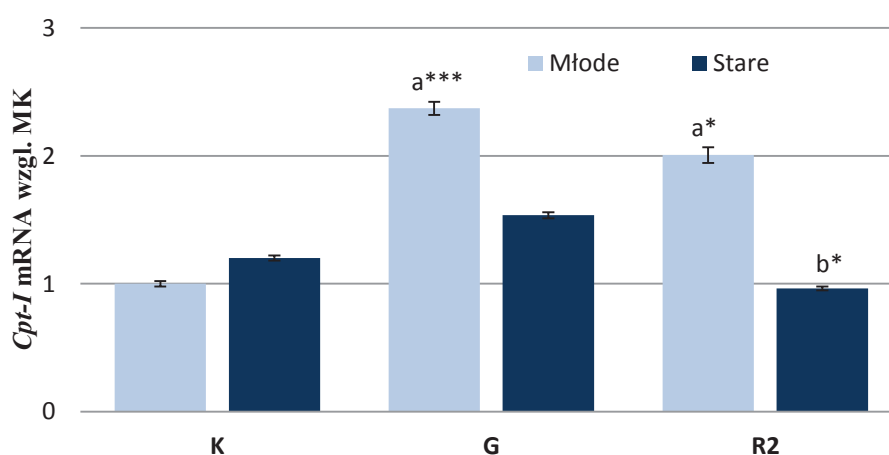
Ryc. 27. Aktywność CPT-I [mol/min/mg] w mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów poddanych głodzeniu i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Liczebność szczurów w grupach doświadczalnych, n= 5; a – wartość znamienne różna względem grupy K w danej grupie wiekowej, b – wartość znamienne różna względem grupy zwierząt G w danej grupie wiekowej. Oznaczenia grup oraz znamienność statystyczna - jak w Tab. 6.

## 5.5.2 Ekspresja *Cpt-I* na poziomie mRNA

### 5.5.2.1 Mięsień sercowy

W **sercu młodych** szczurów, dwudniowe głodzenie spowodowało prawie 2,5-krotny wzrost ekspresji genu *Cpt-I* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 28). Dwukrotnie wyższy poziom ekspresji genu w stosunku do poziomu podstawowego, utrzymał się także po wprowadzeniu diety pełnej (Ryc. 28).

W **mięśniu sercowym starych** szczurów, zaobserwowano jedynie 37% obniżenie ekspresji genu *Cpt-I* względem szczurów głodzonych, pod wpływem dwudniowego karmienia *ad libitum* (Ryc. 28).



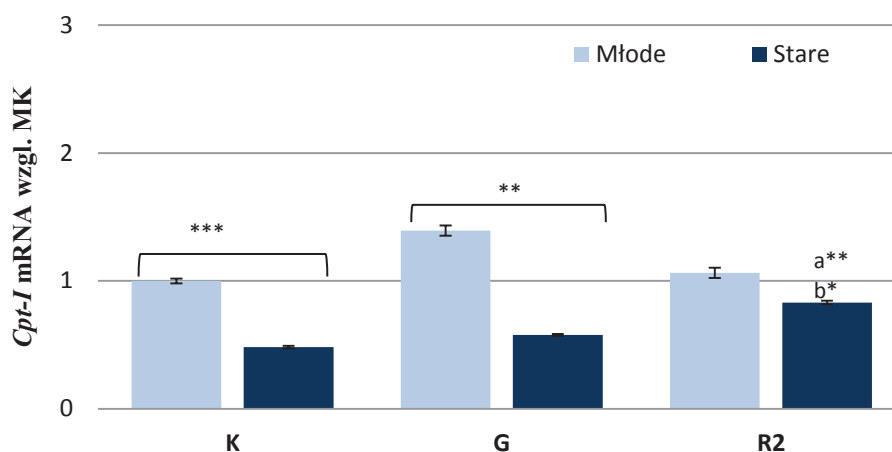
Ryc. 28. Ekspresja genu *Cpt-I* w sercu szczurów głodzonych i karmionych *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia grup, liczebność grup oraz znamienność statystyczna- jak w Tab. 6.

### 5.5.2.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W **mięśniu szkieletowym młodych** szczurów, głodzenie oraz karmienie dietą pełną nie wywołało istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Cpt-I* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 63). Jednak poziom mRNA enzymu w mięśniu młodych szczurów z grup K i G był istotnie wyższy niż u starych zwierząt z tych samych procedur doświadczalnych (Ryc. 29).

W **MSM starych** szczurów, dwudniowe głodzenie nie wywołało istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Cpt-I* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 29). Z kolei, dwudniowe karmienie dietą pełną spowodowało wzrost poziomu mRNA *Cpt-I* o

73% względem grupy kontrolnej oraz o 43% względem grupy szczurów głodzonych (Ryc. 29).



Ryc. 29. Ekspresja genu *Cpt-1* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów głodzonych i karmionych *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia grup, liczebność grup oraz znamienność statystyczna- jak w Tab. 6.

## 5.6. Podsumowanie najważniejszych wyników badań w modelu głodzenie – karmienie

### 5.6.1 Ekspresja genów sirtuin w sercu oraz mięśni szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów

Podsumowanie wyników ekspresji genów sirtuin 1, 3 i 7 w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów poddanych dwudobowemu głodzeniu i przywróceniu karmienia *ad libitum* przedstawiono w Tab. 10.

Tab. 10. Zestawienie wyników ekspresji genów *sirtuin 1, 3 i 7* w mięśniu sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej (względem grupy głodzonej- G)

Wiek / Dieta	K	G	R2	R4	R6
<b>SERCE</b>					
<b>Ekspresja <i>Sirt1</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	b.z.	b.z.	R2, R4 4x < K	
Stare	2,5x > MK	b.z.			
<b>Ekspresja <i>Sirt3</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	5x > K	4x > K	3,5x > K	= K
Stare	S = M	b.z.			2x < K
<b>Ekspresja <i>Sirt7</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	o 30% > K	R2, R4 = K		4x < K
Stare	2x < MK	2x > K	Powolne obniżanie		= K
<b>MIĘSIEŃ SZKIELETOWY MIESZANY</b>					
<b>Ekspresja <i>Sirt1</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	2x < K	3x < K	4x < K	= K
Stare	2x > MK	Nieznamiennie obniżenie o 100%	R2, R4, R6 = K		
<b>Ekspresja <i>Sirt3</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	3x < K	R2, R4, R6 = K		
Stare	o 32% < MK	Nieznamiennie obniżenie o 20%	2x > K (3x > G)		
<b>Ekspresja <i>Sirt7</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	333x < K	R2, R4 o 65% < K (10x > G)		= K
Stare	o 36% < MK	4x < K	R2, R4, R6 = K		

Oznaczenia: **K**- szczury kontrolne, **G**- szczury głodzone, **R2, R4, R6** – szczury głodzone przez 48 godzin, a następnie karmione *ad libitum* przez wskazaną liczbę dni. Skróty: **b.z.**- bez zmian względem kontroli w danej grupie wiekowej, **S**- stare szczury, **M**- młode szczury.

### 5.6.2 Ekspresja genów *Glut4*, *Pgc-1α*, *Ppar-β* w sercu oraz mięśniu szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów głodzonych-karmionych

Podsumowanie wyników ekspresji genów *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta$*  w mięśniu sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów poddanych dwudobowemu głodzeniu i przywróceniu karmienia *ad libitum* przedstawiono w Tab. 11.

Tab. 11. Zestawienie wyników ekspresji genów *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta$*  w mięśniu sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej (względem grupy głodzonej - G)

Wiek / Dieta	K	G	R2	R4	R6
<b>SERCE</b>					
<b>Ekspresja <i>Glut4</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	4x > K	Stopniowe obniżanie		= K
Stare	S = M	b.z.			
<b>Ekspresja <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	2,5x > K	4x > K	4x > K	= K
Stare	S = M	b.z.			
<b>Ekspresja <i>Ppar-<math>\beta</math></i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	o 34% < K	o 64% > K	= K	3x < K
Stare	S = M	Tendencja do stopniowego obniżania ekspresji			5x < K
<b>MIĘŚNIE SZKIELETOWY MIESZANY</b>					
<b>Ekspresja <i>Glut4</i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	5x < K	R, R4, R6 < K		
Stare	2x > MK	b.z.	2x > K	3x > K	3x > K
<b>Ekspresja <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	2x < K	= K	2x < K	2x < K
Stare	2x > MK	Nieznamiennie statystycznie wahania w ekspresji			
<b>Ekspresja <i>Ppar-<math>\beta</math></i> na poziomie mRNA</b>					
Młode	1	5x < K	2x > K (12x > G)	5x > K (11x > G)	Nieznamiennie obniżenie o 50% (2,5x > G)
Stare	S = M	3x < K	R2, R4 = K		3,5x < K

Oznaczenia jak dla Tab. 10.

### 5.6.3 Aktywność i ekspresja palmitoilotransferazy karnitynowej I w sercu i mięśniu szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów głodzonych - karmionych



Podsumowanie wyników ekspresji genu *Cpt-1* i jego aktywności enzymatycznej w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów poddanych dwudobowemu głodzeniu i przywróceniu karmienia *ad libitum* przez dwa dni przedstawiono w Tab. 12.

Tab. 12. Zestawienie wyników ekspresji genu *Cpt-1* i jego aktywności enzymatycznej w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej (względem grupy głodzonej - G)

Wiek / Dieta	K	G	R2
<b>SERCE</b>			
<b>Ekspresja <i>Cpt-1</i> na poziomie mRNA</b>			
<b>Młode</b>	1	2,5x > K	2x > K
<b>Stare</b>	S = M	b.z.	b.z. (o 37% < G)
<b>Aktywność CPT-I</b>			
<b>Młode</b>	1	b.z.	2x > K
<b>Stare</b>	o 54% > MK	b.z. (o 62% > MG)	b.z.
<b>MIĘŚIEN SZKIELETOWY MIESZANY</b>			
<b>Ekspresja <i>Cpt-1</i> na poziomie mRNA</b>			
<b>Młode</b>	1	b.z.	
<b>Stare</b>	2x < MK	b.z.(o 38% < MG)	o 73% > K (43% > G)
<b>Aktywność CPT-I</b>			
<b>Młode</b>	1	b.z.	
<b>Stare</b>	S = M	b.z.	

Oznaczenia jak dla Tab. 10.

## 5.7. Ekspresja genów i białek sirtuin w sercu oraz trzech typach mięśni szkieletowych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*

### 5.7.1 Ekspresja *Sirt1* na poziomie mRNA

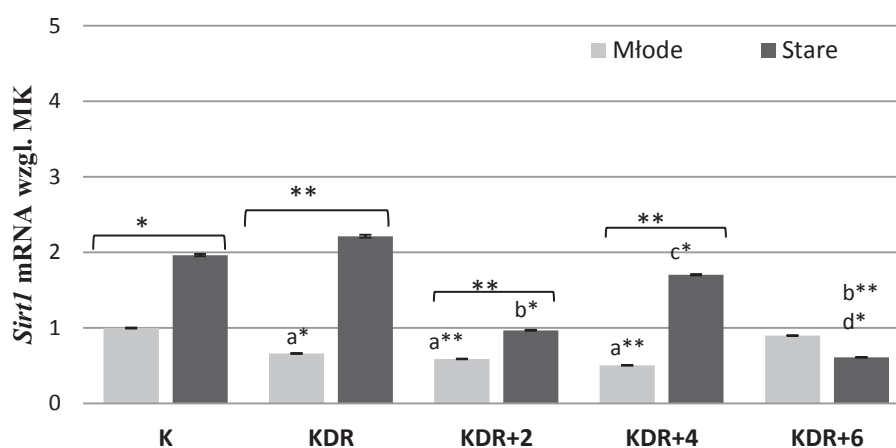
Pomimo licznych prób z wykorzystaniem dwóch rodzajów przeciwciał I-rzędowych anti-SIRT1 (pochodzących od różnych gatunków) oraz przetestowania wielu możliwości rozcieńczeń, nie udało się wykonać pomiaru względnej ilości białka sirtuiny 1 w mięśniach szczurów poddanych KDR. Przedstawione wyniki dotyczą pomiaru ekspresji *Sirt1* na poziomie mRNA.

### 5.7.1.1 Mięsień sercowy

Krótkotrwała dieta restrykcyjna, obniżyła o 34% ekspresję genu sirtuiny 1 w **mięśniu sercowym młodych** szczurów względem grupy kontrolnej (Ryc. 30). Obniżony (o 40 i 50% względem kontroli) poziom mRNA *Sirt1* utrzymał się także po wprowadzeniu 2 i 4- dniowego karmienia *ad libitum*. W 6 dniu karmienia dietą pełną poziom ekspresji genu w sercu szczurów powrócił do poziomu podstawowego.

W **mięśniu sercowym starych** szczurów K, KDR, KDR+2 i KDR+4 ekspresja genu *Sirt1* była istotnie wyższa niż u młodych zwierząt (Ryc. 30). 30-dniowa dieta restrykcyjna nie wywołała istotnych statystycznie zmian poziomu mRNA *Sirt1* w sercach starych szczurów. Karmienie *ad libitum* przez dwa dni ponad 2- krotnie obniżyło ekspresję *Sirt1* względem szczurów KDR, która (z wyjątkiem grupy KDR+4) do końca karmienia dietą pełną utrzymała się poniżej poziomu obserwowanego po diecie restrykcyjnej (Ryc. 30).

W **mięśniu sercowym młodych** szczurów poddanych KDR, zaobserwowano pozytywną korelację między ekspresją genu *Sirt1* a ekspresją *Sirt7* ( $r= 0.72$ ,  $p= 0,0005$ ). W **sercach starych** szczurów z kolei ekspresja genu *Sirt1* była pozytywnie skorelowana z ekspresją: *Sirt3* ( $r= 0.61$ ,  $p= 0,047$ ), *Sirt7* ( $r= 0.76$ ,  $p= 0,0015$ ) oraz *Ppar-β* ( $r= 0.63$ ,  $p= 0,016$ ).



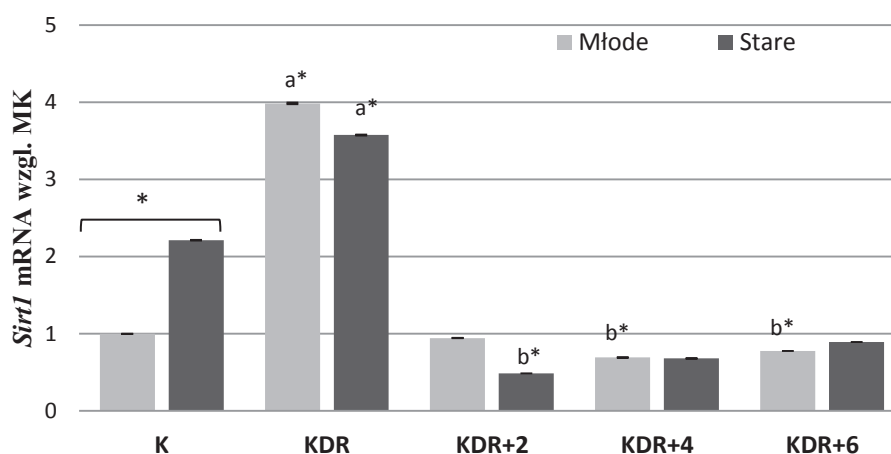
Ryc. 30. Ekspresja genu *Sirt1* w sercu szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

### 5.7.1.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W **mięśniu szkieletowym mieszanym** starych szczurów kontrolnych ekspresja genu *Sirt1* była istotnie wyższa niż u młodych zwierząt (Ryc. 31). KDR spowodowała 4-

krotny u **młodych** i 1,5-krotny u **starych** szczurów wzrost ekspresji genu sirtuiny 1 (Ryc. 31). U zwierząt z obu grup wiekowych przywrócenie diety pełnej po okresie KDR istotnie obniżyło poziom mRNA *Sirt1* względem szczurów z grupy KDR (Ryc. 31).

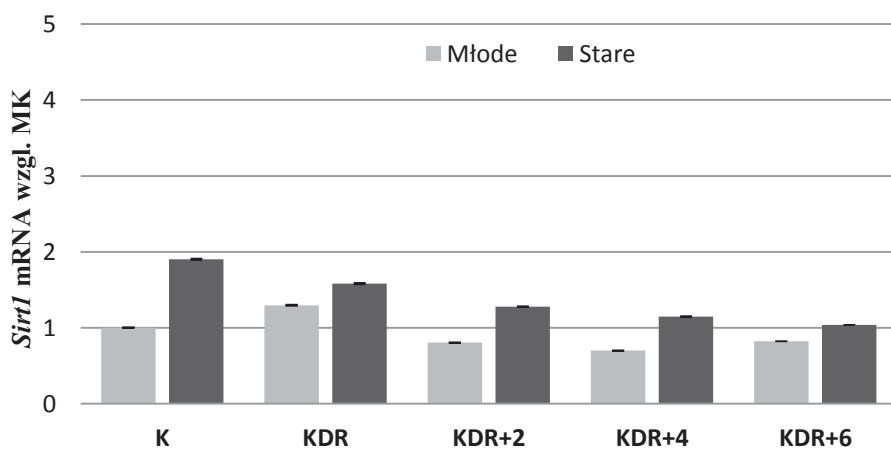
W **MSM starych szczurów** poddanych KDR, zaobserwowano pozytywną korelację między ekspresją genu *Sirt1* a ekspresją *Sirt3* ( $r= 0.95$ ,  $p= 0,0003$ ), *Ppar-β* ( $r= 0.88$ ,  $p= 0,004$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.86$ ,  $p= 0,006$ ).



Ryc. 31. Ekspresja genu *Sirt1* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

### 5.7.1.3 Mięsień płaszczkowaty tydki (SOL, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W **mięśni SOL młodych i starych szczurów**, 30-dniowa dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Sirt1* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 32).



Ryc. 32. Ekspresja genu *Sirt1* w SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

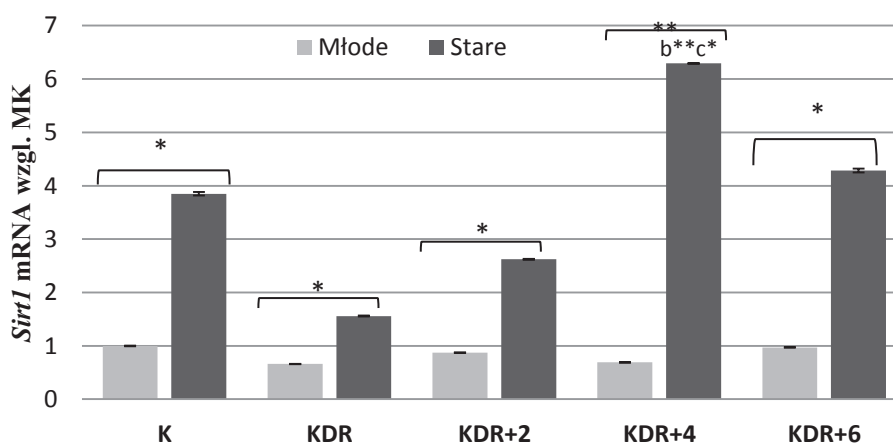
W mięśniu wolnokurczliwym **młodych** szczurów poddanych KDR, zaobserwowano jednak pozytywną korelację między ekspresją genu *Sirt1* a ekspresją *Sirt3* ( $r= 0.83$ ,  $p= 0,0017$ ), *Ppar- $\beta$*  ( $r= 0.82$ ,  $p= 0,002$ ), *Cpt-1* ( $r= 0.61$ ,  $p= 0,047$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.77$ ,  $p= 0,005$ ).

#### 5.7.1.4 Mięsień prostownik palców (EDL, m. biały, szybko kurczliwy)

W **mięśniu EDL młodych szczurów**, 30-dniowa dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Sirt1* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 33).

W **mięśniu EDL starych szczurów** ekspresja genu *Sirt1* była istotnie wyższa niż u młodych zwierząt w każdej grupie doświadczalnej. KDR spowodowała wystąpienie tendencji do obniżenia poziomu mRNA *Sirt1* w mięśniu EDL starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p= 0,99$ ). Przywrócenie karmienia *ad libitum* stopniowo podwyższyło ekspresję genu sirtuiny 1, osiągając w 4 dniu poziom prawie 2,5-krotnie wyższy względem grupy KDR oraz 4-krotnie wyższy względem grupy KDR+2 (Ryc. 33). W 6 dniu diety pełnej, ekspresja genu *Sirt1* w mięśniu EDL starych szczurów wróciła do poziomu podstawowego (Ryc. 33).

W **mięśniu EDL starych szczurów** poddanych KDR, zanotowano silną korelację między ekspresją genu *Sirt1* a ekspresją genów *Ppar- $\beta$*  ( $r= 0.89$ ,  $p= 0,019$ ) i *Pgc-1 $\alpha$*  ( $r= 0.89$ ,  $p= 0,019$ ).



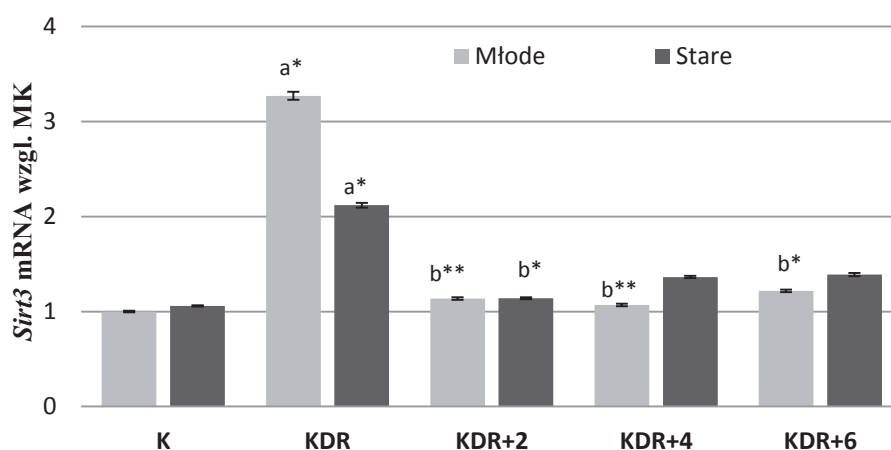
Ryc. 33. Ekspresja genu *Sirt1* w mięśniu EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

## 5.7.2 Ekspresja sirtuiny 3 na poziomie mRNA i białka

### 5.7.2.1 Mięsień sercowy

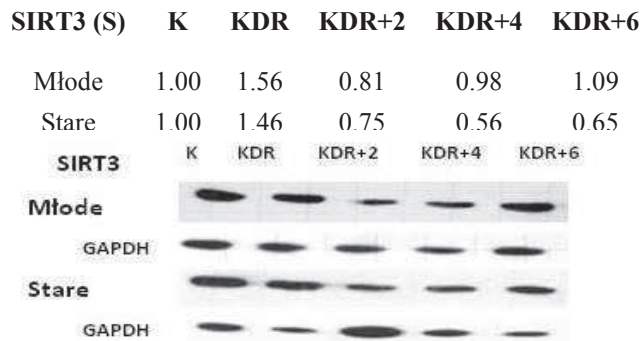
W **mięśniu sercowym**, KDR spowodowała ponad 3-krotny u **młodych** i 2-krotny u **starych** szczurów wzrost ekspresji genu *Sirt3* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 34). Przywrócenie diety pełnej istotnie obniżyło poziom mRNA *Sirt3* względem szczurów z grupy KDR, przywracając tym samym poziom podstawowy szczurów kontrolnych z obu grup wiekowych (Ryc. 34).

W **mięśniu sercowym młodych** szczurów poddanych KDR, zaobserwowano pozytywną korelację między ekspresją genu *Sirt3* a ekspresją *Pgc-1 $\alpha$*  ( $r= 0.73$ ,  $p= 0,0006$ ) i *Glut4* (młode  $r= 0.94$ ,  $p= 10^{-6}$ ). W **sercach starych** szczurów z kolei ekspresja genu *Sirt3* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Ppar- $\beta$*  ( $r= 0.65$ ,  $p= 0,029$ ) i *Glut4* ( $r= 0.64$ ,  $p= 0,048$ ).



Ryc. 34. Ekspresja genu *Sirt3* w sercu szczurów poddanych diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

Uzyskane wyniki znalazły potwierdzenie w ekspresji SIRT3 na poziomie białka (Ryc. 35). Pod wpływem KDR zaobserwowano wzrost SIRT3 w **sercu młodych i starych** szczurów w porównaniu do kontroli, natomiast przywrócenie karmienia *ad libitum* obniżyło tkankowy poziom SIRT3 do poziomu zbliżonego do podstawowego z obu grup wiekowych (Ryc. 35).

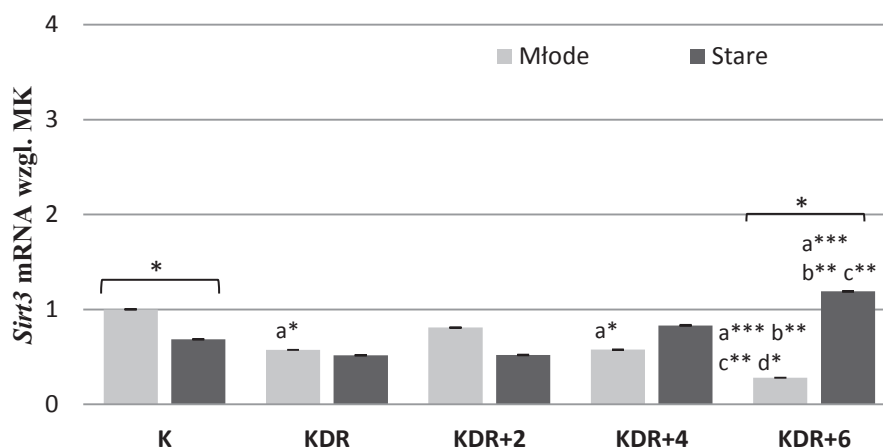


Ryc. 35. Ekspresja białka SIRT3 w sercu (S) szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej. Dół: ekspresja SIRT3 w sercu młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych. Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.

#### 5.7.2.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W MSM ekspresja genu sirtuiny 3 była prawie 1,5-krotnie wyższa u kontrolnych **młodych** szczurów niż u **starych** zwierząt (Ryc. 36). Pod wpływem KDR, u **młodych** szczurów poziom mRNA *Sirt3* obniżył się o 43% w porównaniu do grupy kontrolnej, pozostając poniżej poziomu podstawowego po przywróceniu karmienia dietą pełną przez 6 dni.

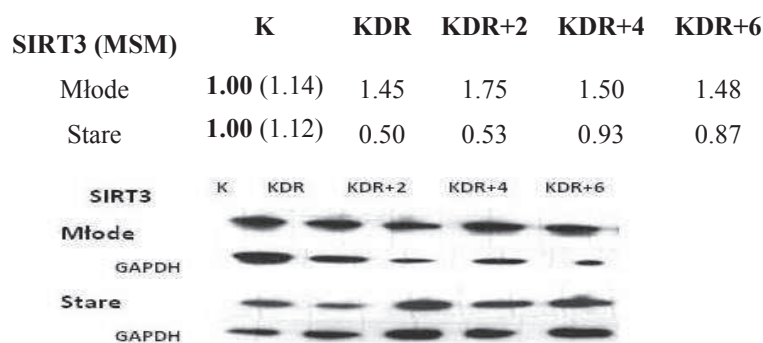
W MSM **starych** szczurów, KDR oraz karmienie dietą pełną przez 2 i 4 dni nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Sirt3* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 36). W 6 dniu karmienia *ad libitum* ekspresja genu sirtuiny 3 w MSM **starych** szczurów wzrosła prawie 2-krotnie względem grup K, KDR i KDR+2 (Ryc. 36).



Ryc. 36. Ekspresja genu *Sirt3* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

Dodatkowo zanotowano, że w mięśni **MSM starych szczurów** poddanych KDR, ekspresja *Sirt3* była silnie skorelowana z ekspresją *Ppar-β* ( $r= 0.86$ ,  $p= 0,006$ ) oraz *Glut4* ( $r= 0.88$ ,  $p= 0,004$ ).

Odmianą sytuację zanotowano w przypadku oceny poziomu białka SIRT3 w **MSM młodych i starych** szczurów (Ryc. 37). U **młodych** zwierząt KDR oraz przywrócenie karmienie dietą pełną spowodowały wzrost **poziomu SIRT3**, o odpowiednio 45%, 75%, 50% i 48% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 37). W **mięśni szkieletowym starych** szczurów, KDR oraz 2-dniowe karmienie dietą pełną spowodowały obniżenie poziomu **SIRT3** o 50% w porównaniu do grupy kontrolnej; po 4 i 6 dniach diety pełnej poziom SIRT3 był zbliżony do szczurów kontrolnych. (Ryc. 37).



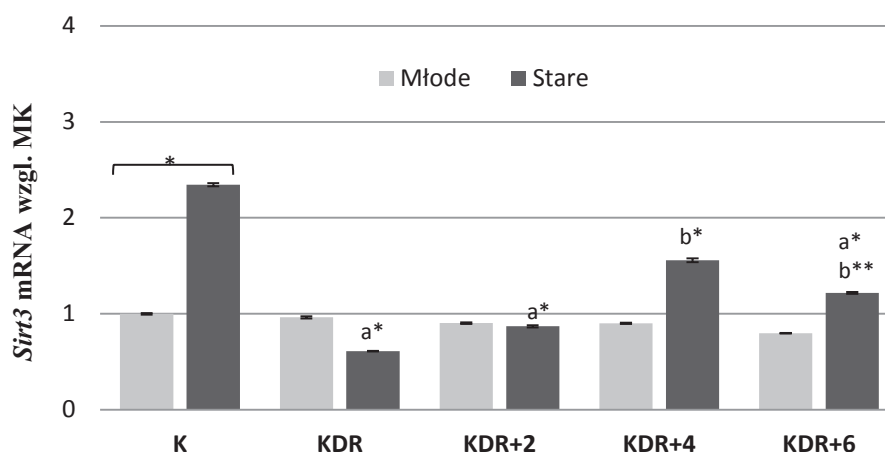
Ryc. 37. Ekspresja białka SIRT3 w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Dół: ekspresja SIRT3 w mięśni szkieletowym młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych (wartość wyjściowa). Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.

### 5.7.2.3 Mięsień płaszczkowaty łydki (*SOL*, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W **mięśni SOL młodych** szczurów KDR oraz przywrócenie diety pełnej nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Sirt3* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 38).

Odmianą sytuację zanotowano w przypadku ekspresji białka SIRT3 w mięśni *SOL* młodych szczurów (Ryc. 39). Pod wpływem KDR, poziom SIRT3 wzrósł o 85% w porównaniu do grupy kontrolnej. Następujące karmienie *ad libitum* przez 2, 4 i 6 dni spowodowało dalszy ponad 2- i 3-krotny wzrost ekspresji białka SIRT3 w mięśni czerwonym młodych szczurów względem grupy kontrolnej (Ryc. 39).

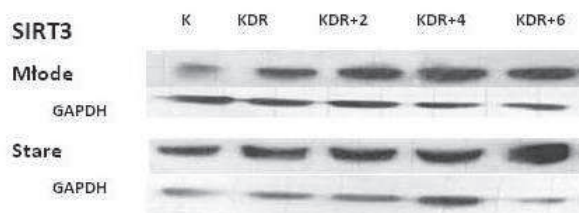
W mięśniu SOL, ekspresja genu *Sirt3* była ponad 2-krotnie wyższa u kontrolnych **starych** szczurów niż u **młodych** zwierząt, co zaobserwowano także na poziomie białka SIRT3 u tych szczurów (Ryc. 38, Ryc. 39). Pod wpływem KDR, ekspresja genu *Sirt3* obniżyła się prawie 4-krotnie w SOL **starych** szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej, pozostając poniżej poziomu podstawowego także przez 6 dni karmienia dietą pełną (Ryc. 38).



Ryc. 38. Ekspresja genu *Sirt3* w mięśniu SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

W mięśniu SOL **starych** szczurów zaobserwowano pod wpływem KDR i 2-dniowego karmienia dietą pełną wzrost poziomu **białka SIRT3** odpowiednio o 43% i 29% (Ryc. 39). Natomiast po 4 i 6 dniach karmienia *ad libitum* poziom SIRT3 był na poziomie szczurów kontrolnych (Ryc. 39).

SIRT3 (SOL)	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
Młode	1.00 (0.24)	1.85	2.39	3.54	3.39
Stare	1.00 (1.34)	1.43	1.29	0.99	1.07



Ryc. 39. Ekspresja białka SIRT3 w mięśniu SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej. Dół: ekspresja SIRT3 w mięśniu SOL młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych (wartość wyjściowa). Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.



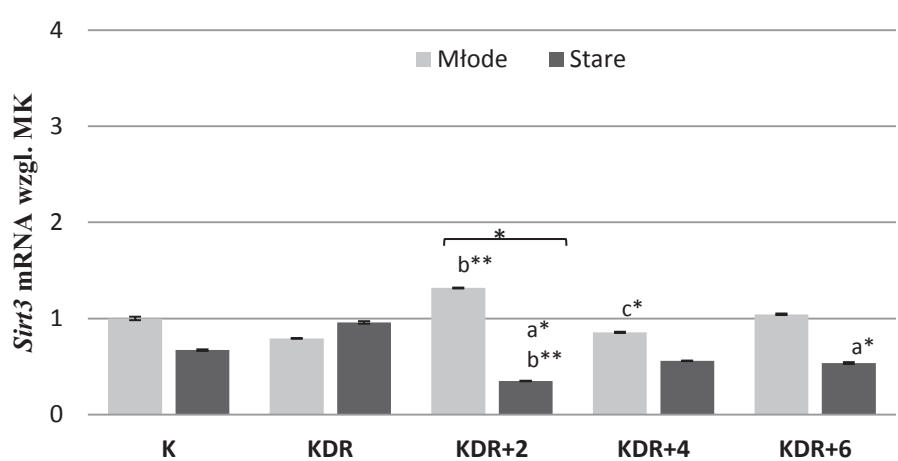
Dodatkowo zanotowano, że w mięśni SOL szczurów poddanych KDR, ekspresja *Sirt3* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Ppar-β* (u młodych  $r= 0.64$ ,  $p= 0,035$ ; starych  $r= 0.83$ ,  $p= 0,042$ ) oraz *Cpt-1* (u młodych  $r= 0.69$ ,  $p= 0,018$ ; starych  $r= 0.83$ ,  $p= 0,042$ ). Ponadto, w mięśni czerwony 5-miesięcznych zwierząt ekspresja genu *Sirt3* była także skorelowana z ekspresją *Sirt1* ( $r= 0.83$ ,  $p= 0,0017$ ) i *Glut4* ( $r= 0.65$ ,  $p= 0,032$ ).

#### 5.7.2.4 Mięsień prostownik palców (EDL, m. biały, szybkokurczliwy)

W **mięśniu EDL młodych** szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna nie wywołała istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Sirt3* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 40). Następujące karmienie *ad libitum* przez dwa dni zwiększyło poziom mRNA *Sirt3* o 67% względem szczurów z grupy KDR. W kolejnych dniach karmienia dietą pełną poziom mRNA *Sirt3* wrócił do poziomu podstawowego (Ryc. 40).

W **mięśniu białym starych** szczurów, KDR nie wywołała istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Sirt3* w porównaniu do grupy kontrolnej. Następujące karmienie *ad libitum* obniżyło o 48% względem kontroli poziom mRNA *Sirt3*, który utrzymał się poniżej poziomu kontrolnego do końca karmienia dietą pełną (Ryc. 40).

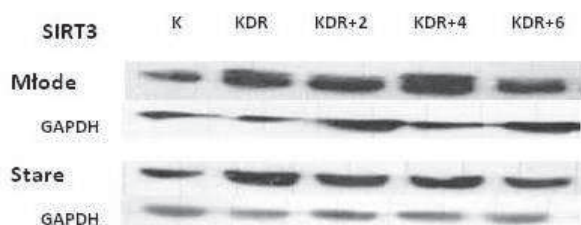
Ponadto zanotowano, że w EDL szczurów poddanych KDR, ekspresja genu *Sirt3* była u **młodych** pozytywnie skorelowana z ekspresją *Glut4* ( $r= 0.65$ ,  $p= 0,03$ ), natomiast u **starych** z ekspresją *Ppar-β* ( $r= 0.94$ ,  $p= 0,005$ ).



Ryc. 40. Ekspresja genu *Sirt3* w mięśni EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

Odmianą sytuację zanotowano w przypadku **ekspresji białka SIRT3** w mięśni EDL młodych i starych szczurów (Ryc. 41). Pod wpływem KDR, ekspresja SIRT3 wzrosła prawie 3-krotnie u **młodych** i 2,5-krotnie u **starych** szczurów względem grup kontrolnych (Ryc. 41). Przywrócenie dwudniowej diety pełnej spowodowało stopniowe obniżanie poziomu SIRT3 w **EDL młodych** i **starych** szczurów o odpowiednio 43% i 39% względem grupy KDR (Ryc. 41). W 6 dniu karmienia dietą pełną poziom białka SIRT3 u młodych szczurów pozostał powyżej poziomu podstawowego, natomiast u starych szczurów wrócił do poziomu szczurów kontrolnych (Ryc. 41).

SIRT3 (EDL)	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
Młode	1.00	2.82	1.61	1.83	1.20
Stare	1.00	2.54	1.55	1.51	1.06

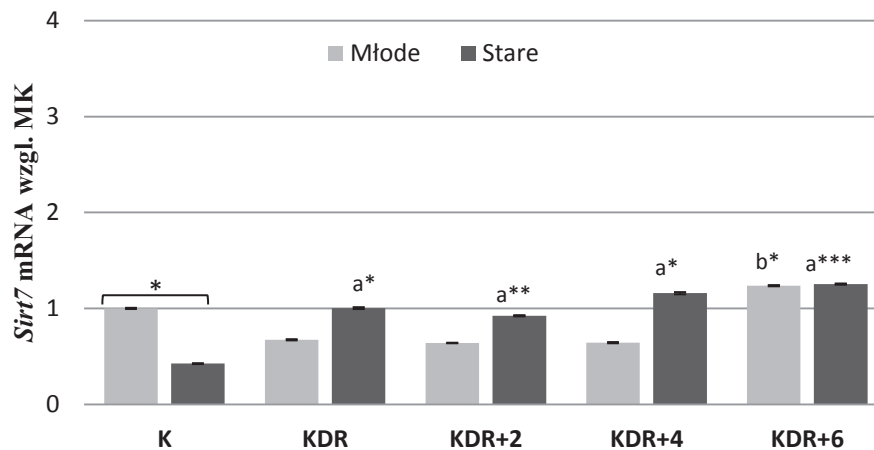


Ryc. 41. Ekspresja białka SIRT3 w mięśni EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Dół: ekspresja SIRT3 w mięśni EDL młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych. Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.

### 5.7.3 Ekspresja sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka

#### 5.7.3.1 Mięsień sercowy

W **mięśni sercowym**, ekspresja **genu *Sirt7*** była ponad 2-krotnie wyższa u kontrolnych **młodych** szczurów niż u **starych** zwierząt, co potwierdzono również na poziomie **białka SIRT7** (Ryc. 42, Ryc. 43). KDR oraz karmienie dietą pełną przez 2 i 4 dni, spowodowały 30% obniżenie ekspresji mRNA *Sirt7* w **sercu młodych** szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej, choć wynik ten nie był znamieny statystycznie. W 6 dniu karmienia *ad libitum* ekspresja genu w sercu wzrosła dwukrotnie względem grupy KDR (Ryc. 42).



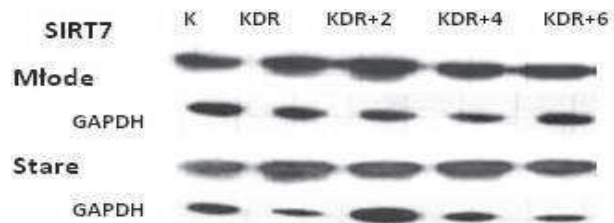
Ryc. 42. Ekspresja genu *Sirt7* w sercu szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

Odmienną sytuację zanotowano w przypadku **ekspresji białka SIRT7 w sercu młodych** szczurów. Pod wpływem KDR i 2- dniowego karmienia dietą pełną poziom SIRT7 wzrósł o 30% względem grupy kontrolnej, natomiast w 4 i 6 dniu karmienia *ad libitum* wrócił do poziomu podstawowego (Ryc. 43).

W **sercu starych** szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna oraz 6-dniowe karmienie dietą pełną spowodowały ponad 2-krotny wzrost poziomu mRNA *Sirt7* w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 42). Wynik ten znalazł potwierdzenie także na poziomie **białka SIRT7** (Ryc. 43). Pod wpływem KDR, ekspresja białka SIRT7 wzrosła i utrzymała się powyżej poziomu kontrolnego do końca karmienia *ad libitum* (Ryc. 43).

Ponadto zanotowano, że w **mięśniu sercowym młodych i starych** szczurów, poddanych KDR, ekspresja genu *Sirt7* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Sirt1* (u młodych  $r= 0.72$ ,  $p= 0,0005$ ; starych  $r= 0.76$ ,  $p= 0,0015$ ). W sercach starych zwierząt zaobserwowano także korelację między ekspresją genu *Sirt7* a *Ppar- $\beta$*  ( $r= 0.60$ ,  $p= 0,022$ ).

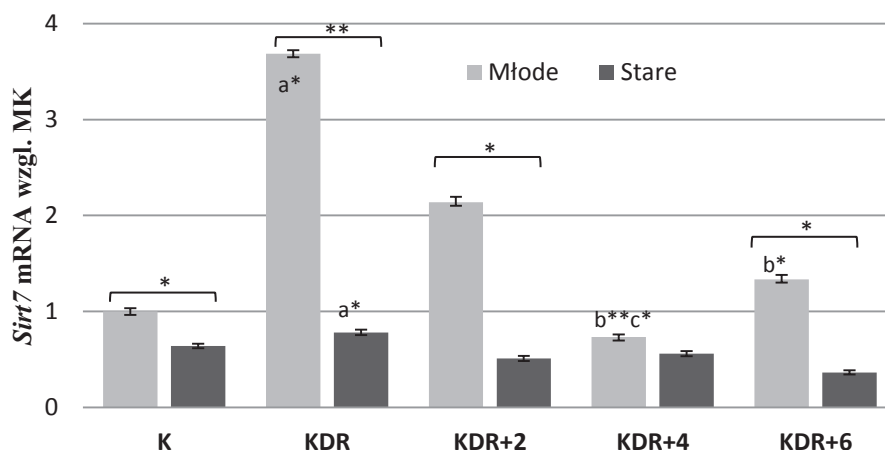
SIRT7 (S)	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
Młode	1.00 (1.30)	1.34	1.38	0.97	0.94
Stare	1.00 (0.1)	2.36	1.28	1.56	1.71



Ryc. 43. Ekspresja białka SIRT7 w sercu (S) szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Dół: ekspresja SIRT7 w sercu młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych (wartość wyjściowa). Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.

#### 5.7.3.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

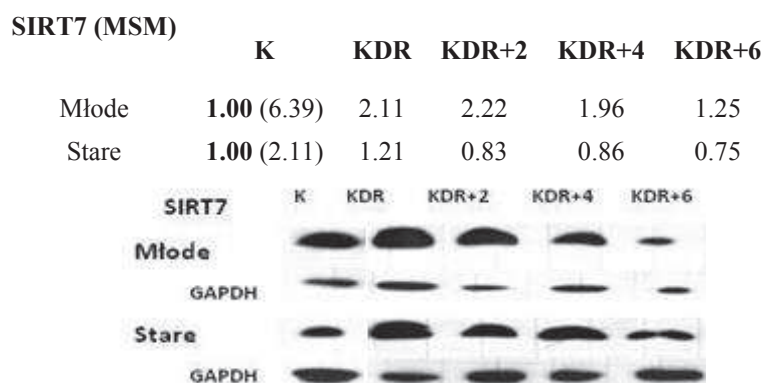
W MSM ekspresja genu *Sirt7* była o 36% wyższa u kontrolnych młodych szczurów niż u starych zwierząt (Ryc. 44). Pod wpływem KDR, w mięśniu młodych szczurów poziom mRNA *Sirt7* wzrósł prawie 4-krotnie i utrzymał się na poziomie 2-krotnie wyższym w porównaniu do grupy kontrolnej także po dwóch dniach karmienia *ad libitum*, choć wynik ten nie był istotny statystycznie. W 4 i 6 dniu karmienia dietą pełną ekspresja genu *Sirt7* wróciła do poziomu podstawowego (Ryc. 44).



Ryc. 44. Ekspresja genu *Sirt7* w mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

Ekspresja białka SIRT7 w mięśni szkieletowym mieszanym młodych szczurów 2-krotnie wzrosła pod wpływem KDR, KDR+2, KDR+4 i pozostała na poziomie powyżej poziomu podstawowego do 6 dnia karmienia *ad libitum* (Ryc. 45)

W mięśni szkieletowym starych szczurów, KDR podwyższyła ekspresję genu *Sirt7* o 22% względem grupy kontrolnej i powróciła do poziomu podstawowego po wprowadzeniu diety pełnej (Ryc. 44). Wynik ten znalazł potwierdzenie także na poziomie białka SIRT7 (Ryc. 45). Pod wpływem KDR, ekspresja białka SIRT7 wzrosła, a następnie po wprowadzeniu diety pełnej obniżyła się do poziomu 15-25% niższego od poziomu podstawowego (Ryc. 45).



Ryc. 45. Ekspresja białka SIRT7 w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Dół: ekspresja SIRT7 w mięśni szkieletowym młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych (wartość wyjściowa). Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.

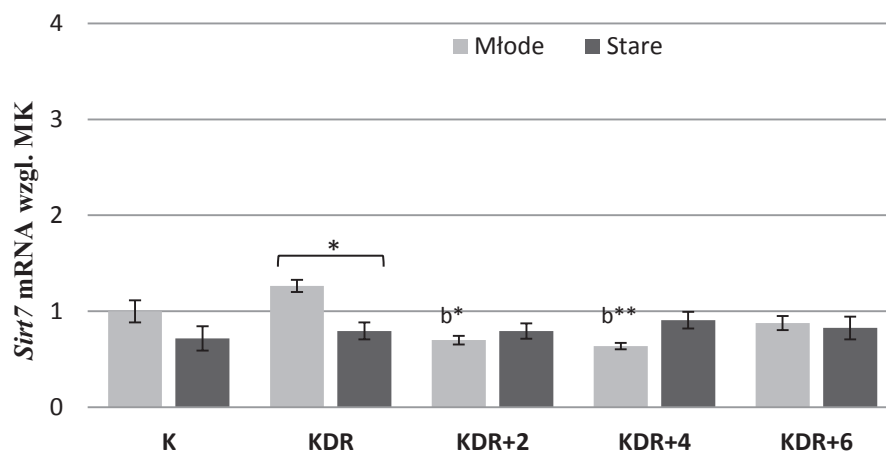
### 5.7.3.3 Mięsień płaszczkowaty tydki (*SOL*, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W mięśni **SOL młodych** szczurów, KDR spowodowała 25% wzrost ekspresji genu *Sirt7* w porównaniu do kontroli, choć wynik ten nie był znamieny statystycznie. Dodatkowo, poziom mRNA *Sirt7* w **SOL młodych** szczurów KDR był istotnie wyższy niż u **starych** zwierząt z tej samej grupy doświadczalnej (Ryc. 46). Na poziomie białka, pod wpływem KDR, **SIRT7** wzrosła w **SOL młodych** szczurów o 17% względem kontroli (Ryc. 47).

Wprowadzenie karmienia *ad libitum* przez 2 i 4 dni obniżyło ekspresję genu *Sirt7* o odpowiednio 45% i 49% względem grupy KDR. Z kolei, w 6 dniu karmienia dietą pełną poziom mRNA *Sirt7* w **SOL młodych** szczurów wrócił do poziomu podstawowego (Ryc.

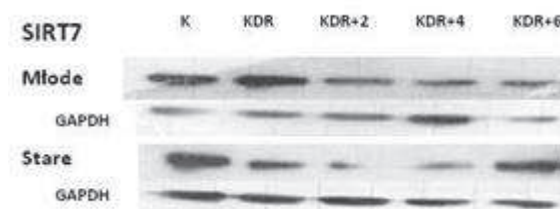
46). Podobną sytuację zanotowano także w przypadku zmian względnej ilości białka SIRT7 w mięśniu SOL młodych szczurów (Ryc. 47).

W mięśniu SOL starych szczurów krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Sirt7* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 46). KDR nie wywołało także zmian w poziomie ekspresji białka SIRT7 w mięśniu czerwonym dwuletnich szczurów, jednak przywrócenie diety pełnej przez 2 dni obniżyło poziom SIRT7 o ponad 50% względem grupy kontrolnej, który nie osiągnął poziomu kontrolnego do końca karmienia *ad libitum* (Ryc. 47).



Ryc. 46. Ekspresja genu *Sirt7* w mięśniu SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

SIRT7 (SOL)		K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
Młode		1.00	1.17	0.90	0.48	1.09
Stare		1.00	0.94	0.47	0.59	0.80

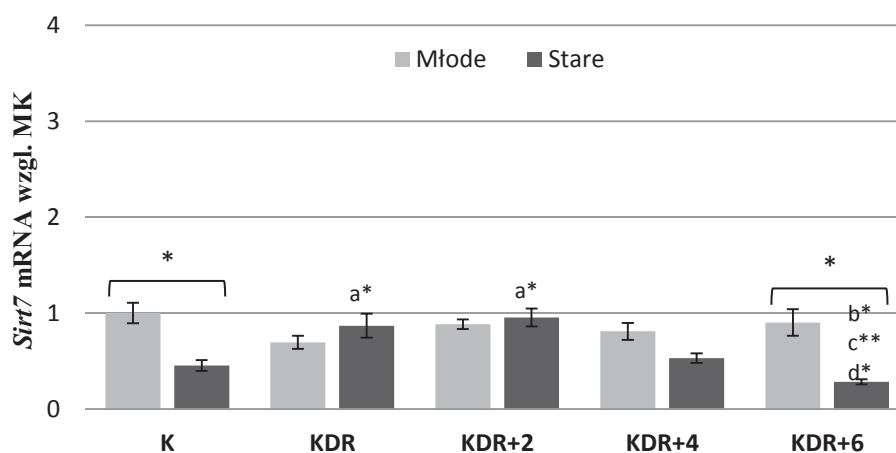


Ryc. 47. Ekspresja białka SIRT7 w mięśniu SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Dół: ekspresja SIRT7 w mięśniu SOL młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych. Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.

#### 5.7.3.4 Mięsień prostownik palców (EDL, m. biały, szybkokurczliwy)

W **mięśniu EDL młodych** szczurów, KDR oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Sirt7* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 48).

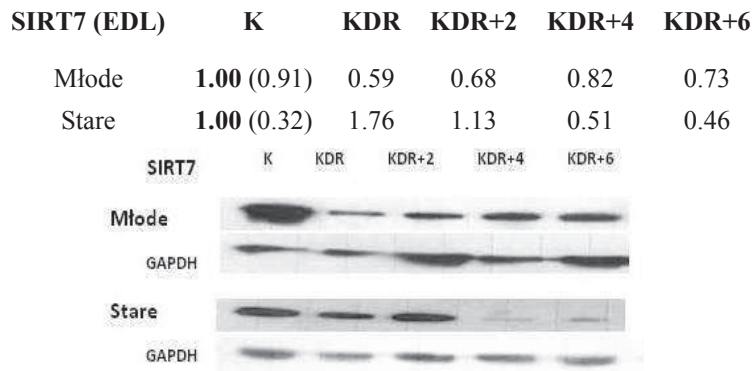
W **mięśniu EDL starych** kontrolnych szczurów, ekspresja sirtuiny 7 była ponad 2-krotnie niższa na poziomie mRNA i białka w porównaniu do **młodych** zwierząt (Ryc. 48, Ryc. 49). Pod wpływem KDR oraz 2 dni karmienia dietą pełną, poziom mRNA *Sirt7* wzrósł 2-krotnie względem szczurów kontrolnych. W 4 dniu karmienia *ad libitum* ekspresja genu wróciła do poziomu podstawowego, natomiast w dniu 6 obniżyła się względem grup KDR, KDR+2 i KDR+4 (Ryc. 48).



Ryc. 48. Ekspresja genu *Sirt7* w mięśniu EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

**Ekspresja białka SIRT7 w mięśniu EDL młodych** szczurów pod wpływem KDR obniżyła się o 40% w porównaniu do kontroli i utrzymała się poniżej poziomu podstawowego po przywróceniu diety pełnej (Ryc. 49).

Na poziomie **białka ekspresja SIRT7 w mięśniu EDL starych** szczurów wzrosła pod wpływem KDR i pozostała na poziomie powyżej kontroli do 2 dnia karmienia dietą pełną (Ryc. 49). W kolejnych dniach karmienia *ad libitum* poziom **białka SIRT7** obniżył się do wartości 2-krotnie niższej od poziomu podstawowego (Ryc. 49).



Ryc. 49. Ekspresja białka SIRT7 w mięśni EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Dół: ekspresja SIRT7 w mięśni EDL młodych i starych zwierząt na poziomie białka; góra: obliczenia densytometryczne w odniesieniu do białka GAPDH. Wartości średnie dla 2 prób, normalizowane względem grupy K w obu grupach wiekowych (wartość wyjściowa). Oznaczenia grup - jak dla Tab. 8.

## 5.8. Ekspresja genów *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta$* w sercu oraz trzech typach mięśni szkieletowych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*

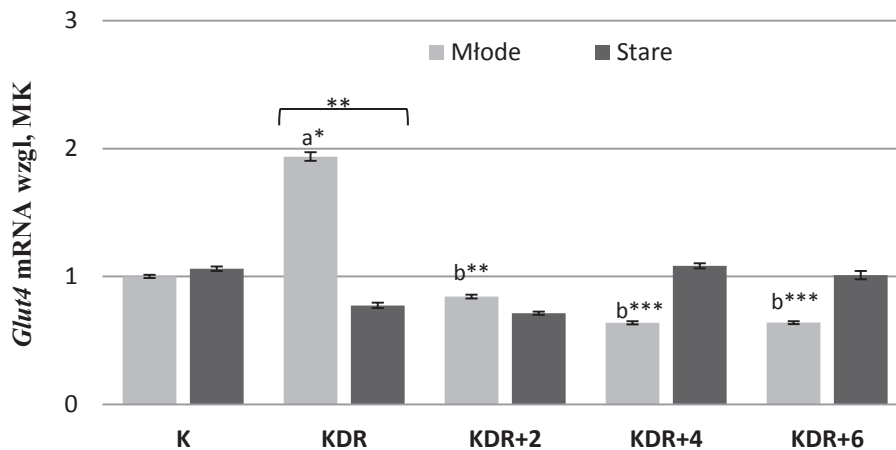
### 5.8.1 Ekspresja *Glut4* na poziomie mRNA

#### 5.8.1.1 Mięsień sercowy

W sercu młodych szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna spowodowała prawie 2-krotny wzrost ekspresji genu *Glut4* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 50). Następujące karmienie *ad libitum* z kolei, istotnie obniżyło poziom mRNA *Glut4* względem KDR do poziomu kontrolnego (Ryc. 50).

W mięśni sercowym starych szczurów krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Glut4* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 50).

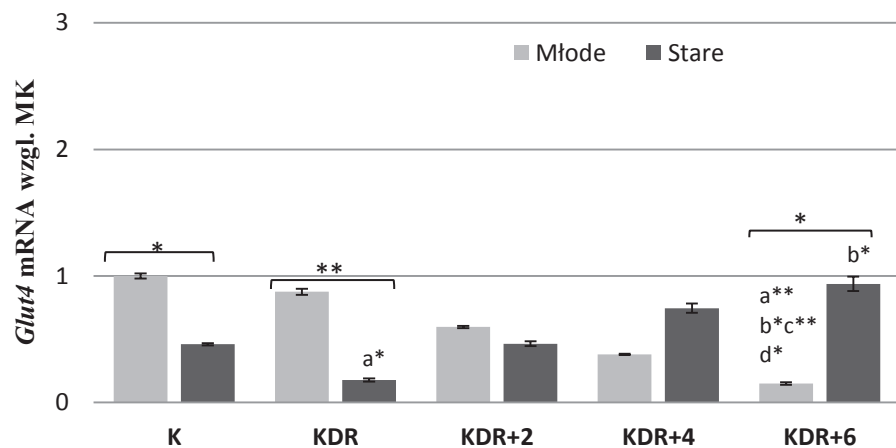




Ryc. 50. Ekspresja genu *Glut4* w sercu szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

#### 5.8.1.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W mięśniu szkieletowym poziom ekspresji genu *Glut4* był ponad 2-krotnie wyższy u młodych szczurów K i KDR niż u starych szczurów z tych samych procedur doświadczalnych (Ryc. 51). Następujące karmienie *ad libitum* spowodowało stopniowe obniżenie poziomu mRNA *Glut4* w MSM młodych szczurów, osiągając poziom ponad 6,5-krotnie niższy względem szczurów kontrolnych (Ryc. 51).



Ryc. 51. Ekspresja genu *Glut4* w mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

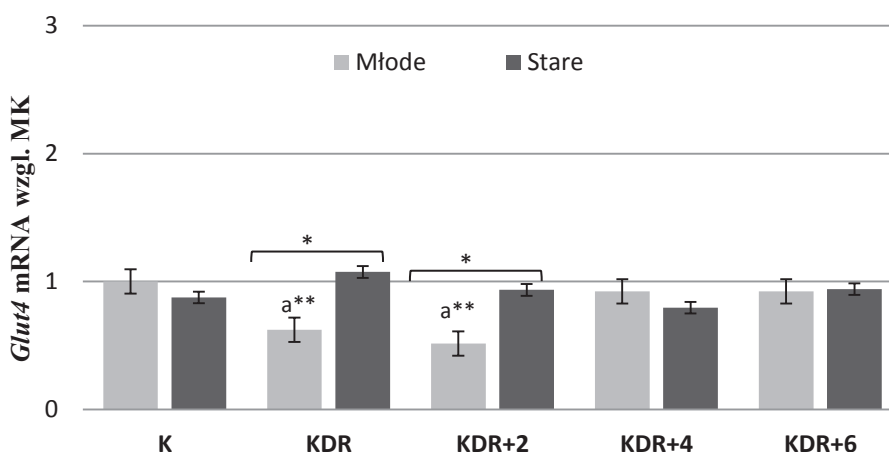
W MSM dwuletnich zwierząt, KDR spowodowała ponad 2,5-krotne obniżenie ekspresji genu *Glut4* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 51). Następujące karmienie

*ad libitum* z kolei, wywołało stopniowy wzrost poziomu mRNA *Glut4*, osiągając w 6 dniu karmienia dietą pełną poziom ponad 5-krotnie wyższy względem grupy KDR oraz 2-krotnie przekraczający poziom podstawowy, choć ostatni wynik nie był istotny statystycznie ( $p=0,97$ ) (Ryc. 51).

#### 5.8.1.3 Mięsień płaszczkowaty łydki (*SOL*, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W **mięśniu czerwonym młodych** szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną przez 2 dni obniżyło **ekspresję genu *Glut4*** o odpowiednio 38% i 49% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 52). Kolejne dni karmienia *ad libitum* przywróciły poziom podstawowy mRNA transportera glukozy (Ryc. 52).

W **mięśniu SOL starych** szczurów, KDR oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA transportera *Glut4* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 52).

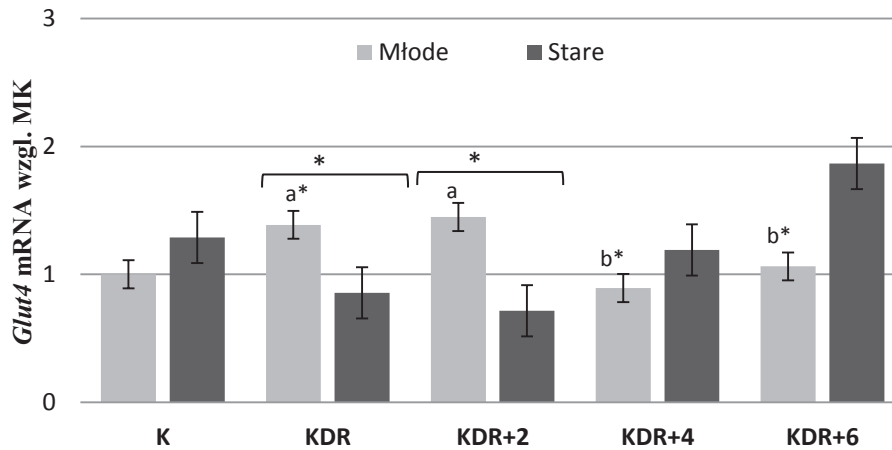


Ryc. 52. Ekspresja genu *Glut4* w mięśniu SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

#### 5.8.1.4 Mięsień prostownik palców (*EDL*, m. biały, szybko kurczliwy)

W **mięśniu białym młodych** szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz 2-dniowe karmienie dietą pełną podwyższyło **ekspresję genu *Glut4*** o odpowiednio 39% i 45% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 53). Kolejne dni karmienia *ad libitum* przywróciły poziom podstawowy mRNA transportera glukozy (Ryc. 53).

W mięśni EDL starych szczurów, KDR oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Glut4* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 53).

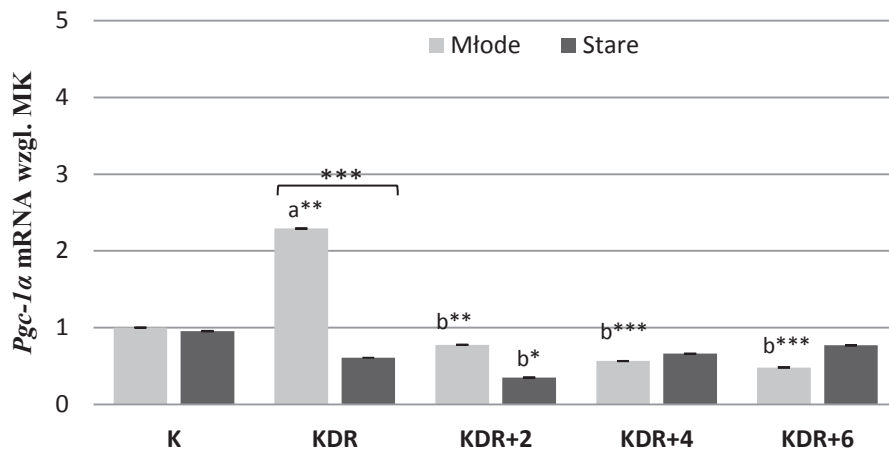


Ryc. 53. Ekspresja genu *Glut4* w mięśni EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

## 5.8.2 Ekspresja *Pgc-1 $\alpha$* na poziomie mRNA

### 5.8.2.1 Mięsień sercowy

W sercu młodych szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna spowodowała ponad 2-krotny wzrost ekspresji genu *Pgc-1 $\alpha$*  w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 54). Dodatkowo, poziom mRNA koaktywatora był istotnie wyższy u młodych szczurów KDR niż u starych zwierząt z tej samej procedury żywieniowej. Następujące karmienie *ad libitum*, istotnie obniżyło poziom mRNA *Pgc-1 $\alpha$*  względem grupy KDR, przywracając tym samym poziom podstawowy ekspresji genu (Ryc. 54).



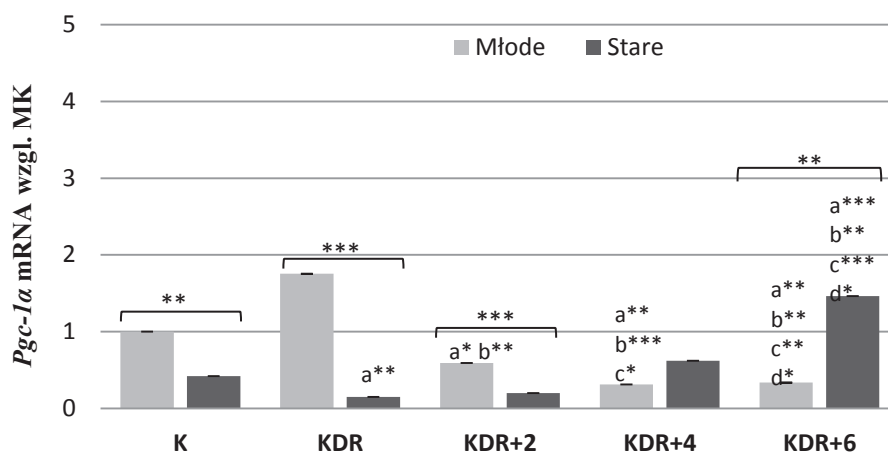
Ryc. 54. Ekspresja genu *Pgc-1α* w sercu szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

W mięśniu sercowym starych szczurów, KDR nie wywoła istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Pgc-1α* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 54). Wprowadzenie karmienia dietą pełną przez 2 dni, obniżyło o 43% poziom mRNA koaktywatora, przywracając poziom podstawowy ekspresji genu w kolejnych dniach karmienia dietą pełną (Ryc. 54).

Ponadto zanotowano, że w mięśniu sercowym młodych szczurów poddanych KDR, ekspresja genu *Pgc-1α* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Glut4* ( $r=0.82$ ,  $p=0,00002$ ), natomiast w sercach starych zwierząt z ekspresją *Ppar-β* ( $r=0.56$ ,  $p=0,039$ ).

#### 5.8.2.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W mięśniu szkieletowym ekspresja genu *Pgc-1α* była ponad 2-krotnie wyższa u młodych kontrolnych szczurów niż u starych zwierząt (Ryc. 55). KDR spowodowała 75% wzrost poziomu mRNA koaktywatora w porównaniu do grupy kontrolnej, choć wynik ten nie był istotny statystycznie ( $p=0,09$ ). Przywrócenie diety pełnej obniżyło ekspresję genu *Pgc-1α* 1,7-krotnie względem grupy kontrolnej oraz prawie 3-krotnie względem grupy KDR (Ryc. 55).



Ryc. 55. Ekspresja genu *Pgc-1α* w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

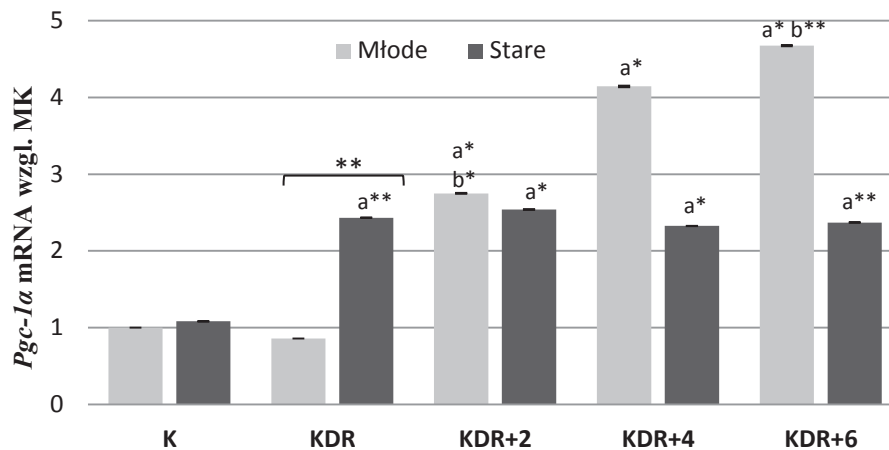
W MSM dwuletnich szczurów, KDR ponad 2,5-krotnie obniżyła ekspresję genu *Pgc-1α* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 55). Następujące karmienie *ad libitum*, wywołało stopniowy wzrost poziomu mRNA *Pgc-1α*, osiągając w 6 dniu poziom prawie 10-krotnie wyższy względem KDR oraz poziom 3,5-krotnie przekraczający poziom podstawowy (Ryc. 55).

Ponadto zanotowano, że w mięśni szkieletowym mieszanym starych szczurów poddanych KDR ekspresja genu *Pgc-1α* była silnie skorelowana z ekspresją *Ppar-β* ( $r=0.81$ ,  $p=0,015$ ) oraz *Glut4* ( $r=0.79$ ,  $p=0,02$ ).

### 5.8.2.3 Mięsień płaszczkowaty łydki (SOL, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W mięśni SOL młodych szczurów, KDR nie wywołała istotnych statystycznie zmian w ekspresji genu *Pgc-1α* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 56). Dodatkowo, poziom mRNA *Pgc-1α* w SOL młodych szczurów z grupy KDR był 2,8-krotnie niższy w porównaniu do starych zwierząt z tej samej procedury doświadczalnej (Ryc. 56). Karmienie *ad libitum* spowodowało wzrost ekspresji genu względem grupy kontrolnej prawie 3-, 4- i 5-krotniej kolejno 2, 4 i 6 dniu diety pełnej (Ryc. 56).

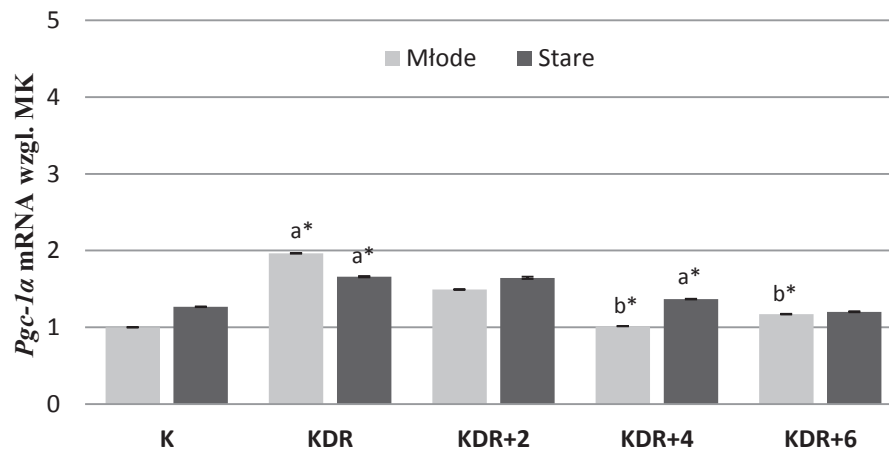
W SOL dwuletnich szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna oraz 6-dniowe karmienie dietą pełną spowodowały prawie 2,5-krotny wzrost poziomu mRNA *Pgc-1α* w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 56).



Ryc. 56. Ekspresja genu *Pgc-1α* w mięśniu SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią ± SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

#### 5.8.2.4 Mięsień prostownik palców (EDL, m. biały, szybko kurczliwy)

W **mięśniu EDL młodych** szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna spowodowała 96% wzrost ekspresji genu *Pgc-1α* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 54). Następujące karmienie *ad libitum*, istotnie obniżyło poziom mRNA *Pgc-1α* względem KDR, przywracając tym samym poziom podstawowy ekspresji genu (Ryc. 57).



Ryc. 57. Ekspresja genu *Pgc-1α* w mięśniu EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią ± SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

W **mięśniu białym starych** szczurów, KDR podwyższyła o 32% ekspresję genu *Pgc-1α* w porównaniu do grupy kontrolnej i utrzymała się powyżej poziomu podstawowego do 4 dnia karmienia dietą pełną (Ryc. 57). W 6 dniu karmienia *ad libitum* poziom mRNA koaktywatora wrócił do poziomu kontrolnego (Ryc. 57).

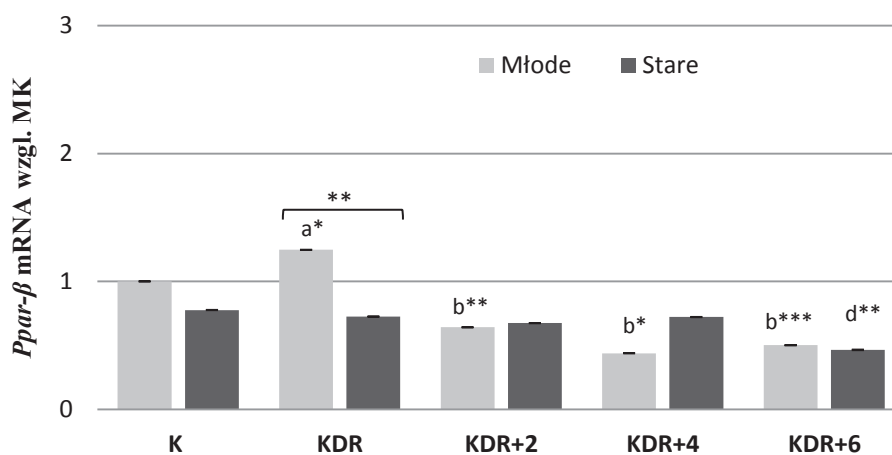
Ponadto, zanotowano, że w **mięśni EDL** szczurów poddanych KDR, ekspresja genu *Pgc-1 $\alpha$*  była u **młodych** zwierząt pozytywnie skorelowana z ekspresją *Glut4* ( $r= 0.63$ ,  $p= 0,039$ ), natomiast u **starych** z *Ppar- $\beta$*  ( $r= 0.89$ ,  $p= 0,019$ ).

### 5.8.3 Ekspresja *Ppar- $\beta$* na poziomie mRNA

#### 5.8.3.1 Mięsień sercowy

W **sercu młodych** szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna spowodowała 25% wzrost **ekspresji genu *Ppar- $\beta$***  w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 58). Dodatkowo, poziom mRNA receptora był istotnie wyższy u młodych szczurów KDR niż u starych zwierząt z tej samej grupy doświadczalnej. Następujące karmienie *ad libitum*, istotnie obniżyło poziom mRNA *Ppar- $\beta$*  względem grupy KDR, przywracając tym samym poziom podstawowy ekspresji genu (Ryc. 58).

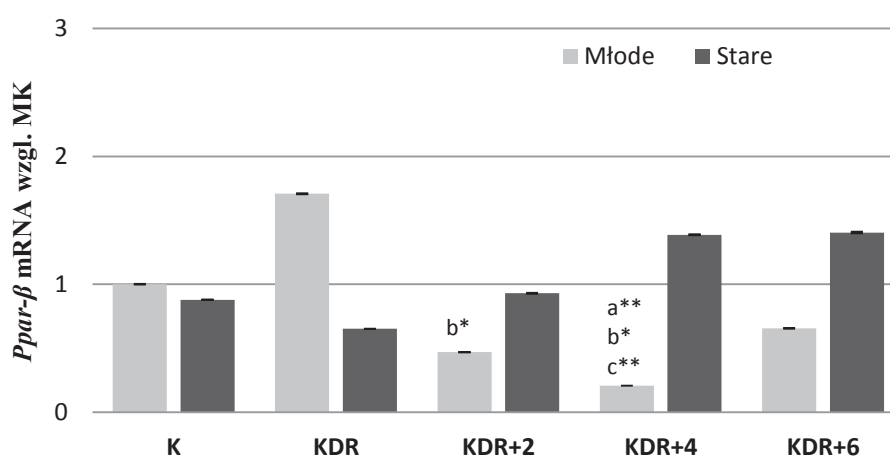
W **mięśniu sercowym starych** szczurów krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie **mRNA *Ppar- $\beta$***  w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 58). Ponadto, w **sercach starych** szczurów, poddanych KDR, zaobserwowano pozytywną korelację między ekspresją genu *Ppar- $\beta$*  a ekspresją *Glut4* ( $r= 0.66$ ,  $p= 0,013$ ).



Ryc. 58. Ekspresja genu *Ppar- $\beta$*  w sercu szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

### 5.8.3.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W **MSM młodych szczurów**, KDR spowodowała 71% wzrost **ekspresji genu *Ppar-β*** w porównaniu do grupy kontrolnej, choć wynik ten nie był istotny statystycznie ( $p=0,56$ ) (Ryc. 59). Przywrócenie 2-dniowej diety pełnej obniżyło poziom mRNA *Ppar-β* o 84% względem grupy KDR. W 4 dniu karmienia *ad libitum*, zaobserwowano dalsze zmniejszanie się ekspresji genu względem grup K, KDR i KDR+2 o odpowiednio 79%, 88% i 55% (Ryc. 59). W 6 dniu karmienia *ad libitum* poziom mRNA receptora wrócił do poziomu podstawowego ekspresji genu (Ryc. 59).



Ryc. 59. Ekspresja genu *Ppar-β* w mięśni szkieletowym mieszanym poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

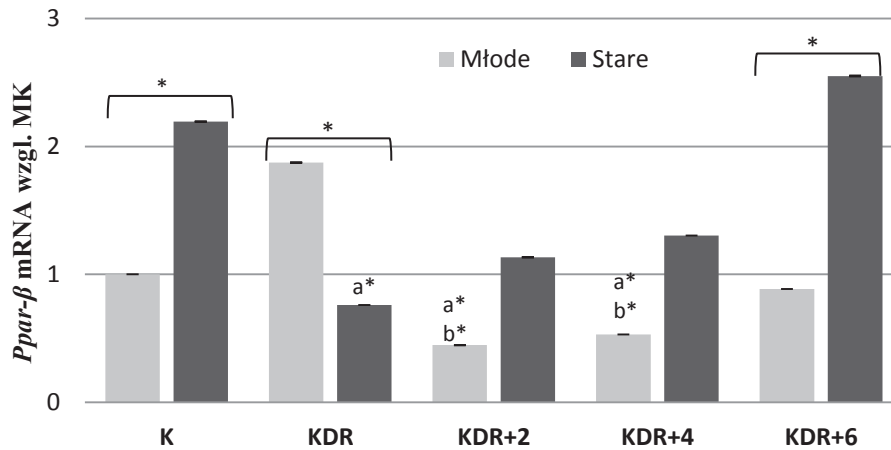
W **MSM starych szczurów**, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Ppar-β* w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 59). Ponadto zanotowano, że w **mięśniu MSM starych** szczurów ekspresja genu *Ppar-β* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Glut4* ( $r=0.93$ ,  $p=0,0009$ ).

### 5.8.3.3 Mięsień płaszczkowaty łydki (SOL, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W **mięśniu SOL ekspresja genu *Ppar-β*** była dwukrotnie niższa u kontrolnych **młodych** szczurów niż u **starych** zwierząt (Ryc. 60). KDR podwyższyła poziom mRNA receptora o 87% w **mięśniu młodych** szczurów, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie ( $p=0,26$ ). Przywrócenie karmienia *ad libitum* istotnie obniżyło ekspresję genu *Ppar-β* w mięśni czerwonym młodych szczurów o 76% względem grupy KDR i



55% względem kontroli w 2 dniu karmienia dietą pełną oraz o 72% względem grupy KDR i 47% względem grupy kontrolnej w 4 dniu karmienia dietą pełną (Ryc. 60). W 6 dniu poziom mRNA *Ppar-β* wrócił do poziomu podstawowego.



Ryc. 60. Ekspresja genu *Ppar-β* w mięśni SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią ± SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

W **mięśni SOL starych** szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna prawie 3-krotnie obniżyła ekspresję genu *Ppar-β* względem grupy kontrolnej (Ryc. 60). Dodatkowo, poziom mRNA *Ppar-β* w **SOL starych** szczurów z grupy KDR był 2,5-krotnie niższy w porównaniu do młodych zwierząt z tej samej procedury doświadczalnej. Przywrócenie karmienia *ad libitum* przez 2 i 4 dni, spowodowało powolny wzrost ekspresji genu do osiągnięcia poziomu podstawowego w 6 dniu diety pełnej (Ryc. 60). Dodatkowo, poziom mRNA *Ppar-β* w **SOL starych** szczurów z grupy KDR+6 był prawie 3-krotnie wyższy w porównaniu do młodych zwierząt z tej samej procedury doświadczalnej (Ryc. 60).

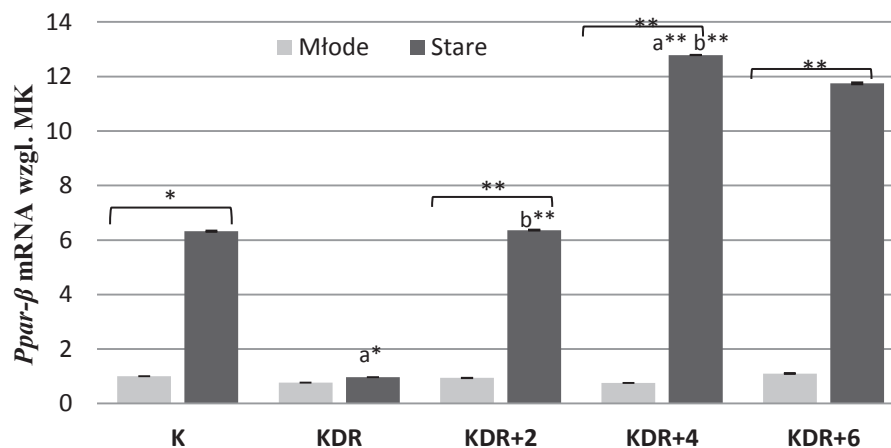
#### 5.8.3.4 Mięsień prostownik palców (*EDL, m. biały, szybkokurczliwy*)

W **mięśni EDL młodych** szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA receptora *Ppar-β* względem grupy kontrolnej (Ryc. 61).

W **mięśni białym starych** kontrolnych szczurów ekspresja genu *Ppar-β* była 6-krotnie wyższa niż u kontrolnych **młodych** zwierząt (Ryc. 61). Pod wpływem KDR, poziom mRNA receptora w **EDL dwuletnich** szczurów obniżył się ponad 6,5-krotnie w porównaniu do grupy kontrolnej. W 2 dniu karmienia *ad libitum* ekspresja genu *Ppar-β*

wróciła do poziomu podstawowego, natomiast w kolejnych wzrosła ponad 2-krotnie względem grupy kontrolnej (Ryc. 61). Dodatkowo, na każdym etapie karmienia dietą pełną ekspresja genu *Ppar-β* była od 6-12 razy wyższa w mięśniu EDL starych szczurów niż u młodych zwierząt (Ryc. 61).

Ponadto zanotowano, że ekspresja genu *Ppar-β* w **mięśniu EDL dwuletnich** zwierząt była pozytywnie skorelowana z *Glut4* ( $r= 0.94$ ,  $p= 0,005$ ) oraz *Cpt-I* ( $r= 0.9$ ,  $p= 0,037$ ).



Ryc. 61. Ekspresja genu *Ppar-β* w mięśniu EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum*. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebności oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

## 5.9. Aktywność i ekspresja palmitoilotransferazy karnitynowej I w sercu oraz trzech typach mięśni szkieletowych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni

### 5.9.1 Aktywność CPT-I

#### 5.9.1.1 Mięsień sercowy

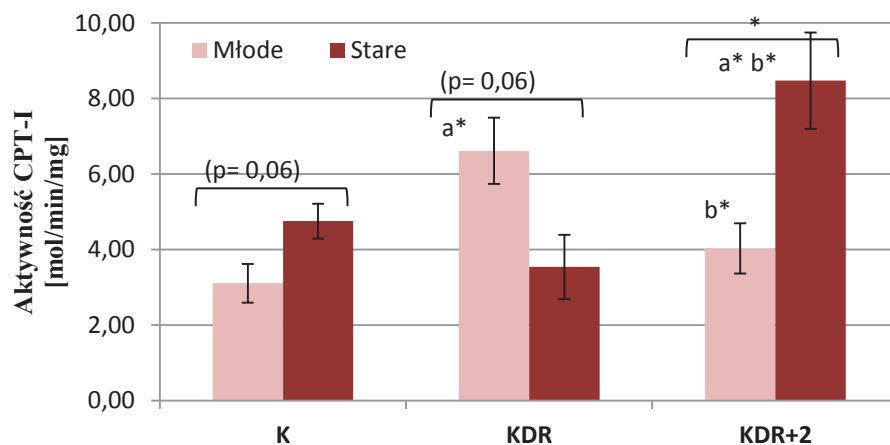
W mięśniu sercowym poziom podstawowy aktywności enzymu CPT-I był najwyższy ze wszystkich badanych tkanek mięśniowych.

W **sercu młodych** szczurów, KDR spowodowała ponad 2-krotny wzrost aktywność CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 62). Poziom aktywność enzymu w sercu

młodych szczurów poddanych KDR był istotnie wyższy niż u starych zwierząt z tej samej procedury doświadczalnej. Przywrócenie karmienia *ad libitum* obniżyło aktywność transportera w sercu młodych szczurów o 39% względem grupy KDR, przywracając tym samym poziom podstawowy enzymu (Ryc. 62).

Aktywność CPT-I była o 54% wyższa w **sercu starych** kontrolnych szczurów niż u **młodych** zwierząt, choć wynik ten był na granicy istotności statystycznej (Ryc. 62).

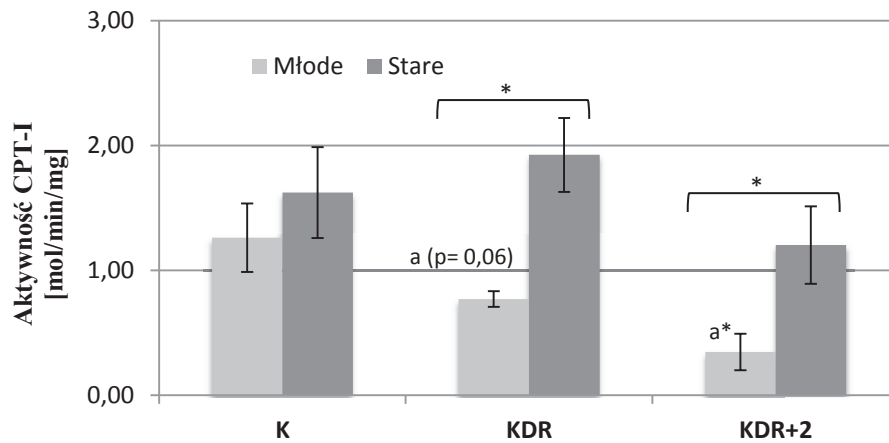
Inaczej niż u młodych zwierząt KDR nie wywołała istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w sercu starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei, dwudniowe karmienie dietą pełną spowodowało wzrost aktywności enzymu o 77% względem grupy kontrolnej oraz o 143% względem grupy KDR (Ryc. 62).



Ryc. 62. Aktywność CPT-I [mol/min/mg] w sercu szczurów poddanych diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Liczebność szczurów w grupach doświadczalnych, n= 5; a – wartość znamienne różna względem grupy K w danej grupie wiekowej, b – wartość znamienne różna względem grupy zwierząt KDR w danej grupie wiekowej. Oznaczenia grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

#### 5.9.1.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W **mięśniu szkieletowym młodych** szczurów, KDR oraz dwudniowe karmienie dietą pełną obniżyło aktywność CPT-I o odpowiednio 39% i 72% w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 63).



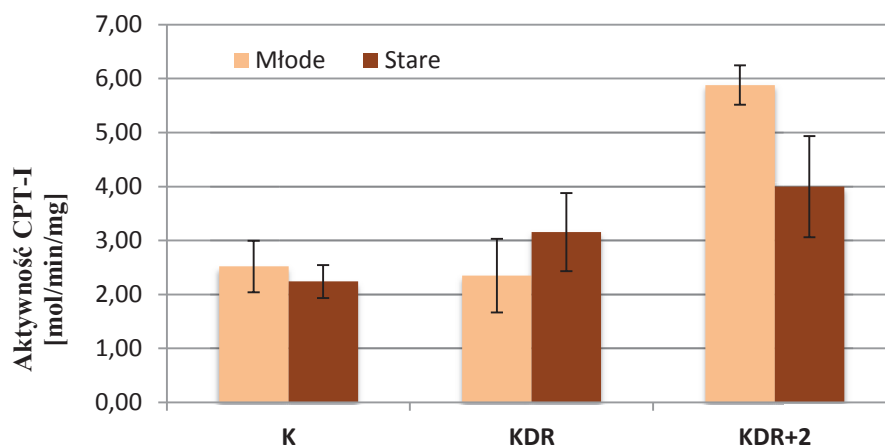
Ryc. 63. Aktywność CPT-I [mol/min/mg] w mięśni szkieletowym mieszanym szczurów poddanych diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Liczebność szczurów w grupach doświadczalnych,  $n=5$ ; a – wartość znamienne różna względem grupy K w danej grupie wiekowej, b – wartość znamienne różna względem grupy zwierząt KDR w danej grupie wiekowej. Oznaczenia grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

U **starych** zwierząt, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 63). Jednak poziom aktywności enzymu w mięśni starych szczurów z grup KDR i KDR+2 był istotnie wyższy niż u młodych zwierząt z tych samych procedur doświadczalnych (Ryc. 63).

#### 5.9.1.3 Mięsień płaszczkowaty łydki (SOL, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W **mięśni czerwonym młodych** szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna nie wywoła istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 64). Wprowadzenie karmienia *ad libitum* podwyższyło ponad 2-krotnie aktywność enzymu względem grupy kontrolnej oraz KDR, jednak wynik ten nie był znamieny statystycznie ( $p=0,23$ ) (Ryc. 64).

W **mięśni SOL starych** szczurów, KDR oraz karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 64).



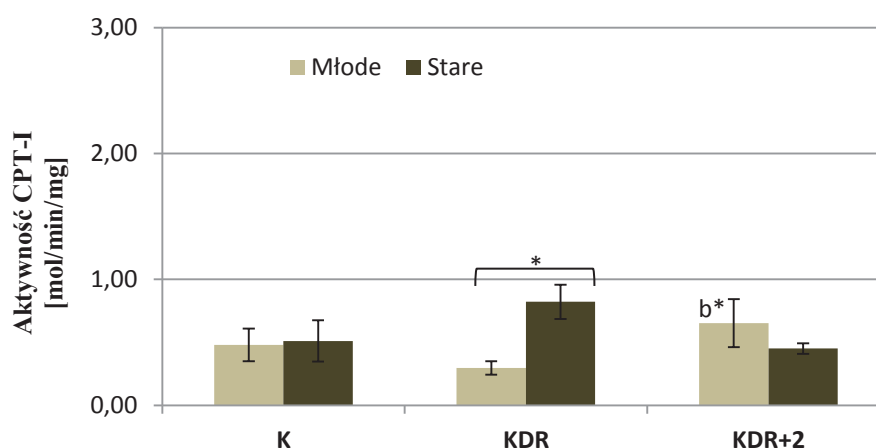
Ryc. 64. Aktywność CPT-I [mol/min/mg] w mięśni SOL szczurów poddanych diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Liczebność szczurów w grupach doświadczalnych, n= 5; a – wartość znamienne różna względem grupy K w danej grupie wiekowej, b – wartość znamienne różna względem grupy zwierząt KDR w danej grupie wiekowej. Oznaczenia grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

#### 5.9.1.4 Mięsień prostownik palców (EDL, m. biały, szybko kurczliwy)

W mięśni białym podstawowy poziom aktywności enzymu CPT-I był niższy niż w mięśni czerwonym.

W **mięśni EDL młodych** szczurów KDR zaobserwowano zmniejszenie aktywności CPT-I w porównaniu do szczurów kontrolnych, choć wynik ten nie był istotny statystycznie (Ryc. 65). Z kolei, karmienie *ad libitum* 2-krotnie podwyższyło aktywność CPT-I względem grupy KDR oraz przywróciło poziom kontrolny enzymu (Ryc. 65).

W **mięśni białym starych** szczurów, KDR oraz karmienie dietą pełną nie wywołało istotnych statystycznie zmian w aktywności CPT-I w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak poziom aktywności enzymu u dwuletnich szczurów KDR był istotnie wyższy niż u młodych zwierząt (Ryc. 65).

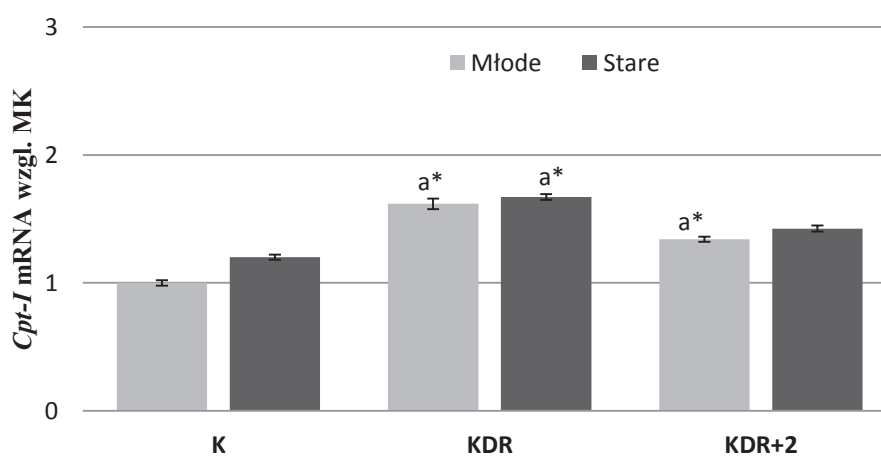


Ryc. 65. Aktywność CPT-I [mol/min/mg] w mięśni EDL szczurów poddanych diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Liczebność szczurów w grupach doświadczalnych, n= 5; a – wartość znamienne różna względem grupy K w danej grupie wiekowej, b – wartość znamienne różna względem grupy zwierząt KDR w danej grupie wiekowej. Oznaczenia grup oraz znamienność statystyczna - jak dla Tab. 8.

## 5.9.2 Ekspresja *Cpt-I* na poziomie mRNA

### 5.9.2.1 Mięsień sercowy

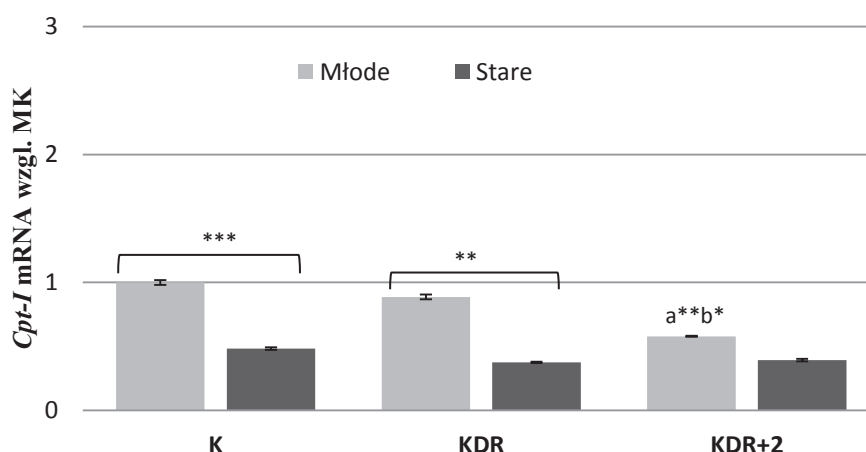
Krótkotrwała dieta restrykcyjna, spowodowała wzrost ekspresji genu *Cpt-I* w **mięśniu sercowym młodych** szczurów o 62% oraz o 39% u **starych** zwierząt w porównaniu do grup kontrolnych (Ryc. 66). Poziom ten, choć lekko obniżony, utrzymał się powyżej poziomu podstawowego po przywróceniu 2-dniowego karmienia dietą pełną, ale tylko u młodych szczurów, ponieważ u starych zwierząt różnica nie była istotna statystycznie ( $p=0,37$ ) (Ryc. 66).



Ryc. 66. Ekspresja genu *Cpt-I* w sercu szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna- jak dla Tab. 8.

### 5.9.2.2 Mięsień szkieletowy mieszany (MSM)

W **mięśniu szkieletowym mieszanym**, ekspresja genu *Cpt-I* była ponad 2-krotnie wyższa u młodych szczurów z grupy kontrolnej i poddanej KDR niż u starych zwierząt z tych samych procedur doświadczalnych (Ryc. 67).



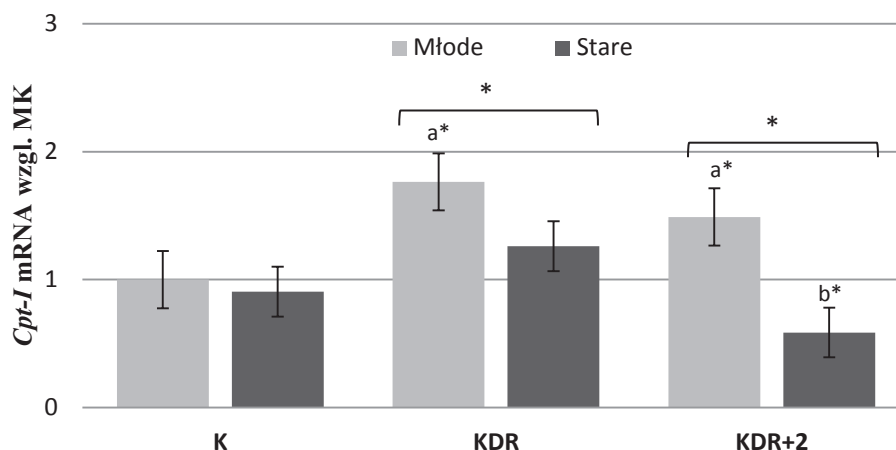
Ryc. 67. Ekspresja genu *Cpt-I* w mięśniu szkieletowym mieszanym szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna- jak dla Tab. 8.

W **MSM młodych** szczurów KDR nie wywołała istotnych statystycznie zmian w poziomie mRNA *Cpt-I* w porównaniu do szczurów kontrolnych. Przywrócenie 2-dniowego karmienia *ad libitum* obniżyło ekspresję genu o 42% względem kontroli oraz o 35% względem grupy KDR (Ryc. 67).

W **MSM starych** szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz 2-dniowe karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji genu *Cpt-I* w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 67). Dodatkowo zaobserwowano, że **ekspresja genu *Cpt-I* w mięśniu szkieletowym starych** szczurów korelowała z **stężeniem leptyny** w surowicy krwi tych zwierząt ( $r = 0.53$ ,  $p = 0,0003$ ).

### 5.9.2.3 Mięsień płaszczkowaty tydki (SOL, m. czerwony, wolnokurczliwy)

W **mięśniu SOL młodych** szczurów, KDR oraz dwa dni karmienia dietą pełną spowodowały odpowiednio 76% i 49% wzrost ekspresji genu *Cpt-I* w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 68). W mięśniu czerwonym młodych szczurów z grup KDR oraz KDR+2 poziom mRNA *Cpt-I* był istotnie wyższy niż u starych zwierząt z tych samych procedur doświadczalnych (Ryc. 68).



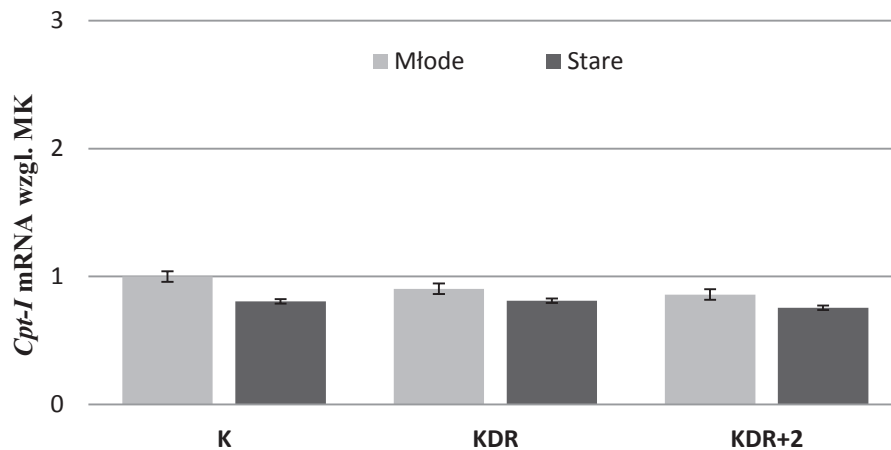
Ryc. 68. Ekspresja genu *Cpt-1* w mięśni SOL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna- jak dla Tab. 8.

W mięśni SOL dwuletnich szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna nie wywołała istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji genu *Cpt-1* w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 68). Z kolei, dwudniowe karmienie dietą pełną 2-krotnie obniżyło ekspresję genu względem szczurów z grupy KDR (Ryc. 68).

#### 5.9.2.4 Mięsień prostownik palców (EDL, m. biały, szybko kurczliwy)

W mięśni EDL młodych i starych szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz 2-dniowe karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji genu *Cpt-1* w porównaniu do szczurów kontrolnych (Ryc. 69).





Ryc. 69. Ekspresja genu *Cpt-1* w mięśni EDL szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni. Wartości przedstawiają średnią  $\pm$  SE. Poziom mRNA genu został znormalizowany względem poziomu ekspresji młodych szczurów kontrolnych (MK=1). Oznaczenia, liczebność grup oraz znamienność statystyczna- jak dla Tab. 8.

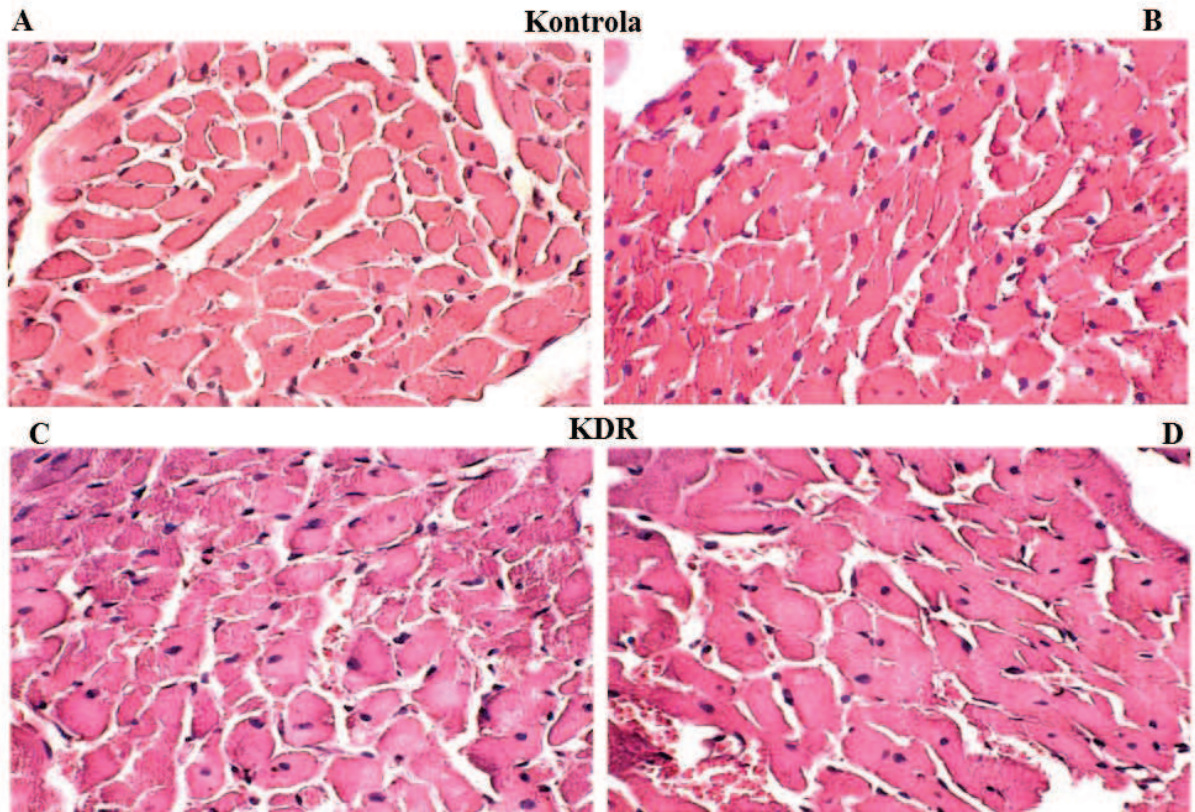
#### 5.10. Ocena struktury mięśnia sercowego szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez 2, 4 i 6 dni

Na mikrofotografiach 72-75 przedstawiono strukturę mikroskopową mięśnia sercowego młodych i starych szczurów poddanych KDR (Ryc. 71) i następującemu karmieniu *ad libitum* (Ryc. 73, Ryc. 74, Ryc. 75), dla uwidocznienia obecności tkanki łącznej między kardiomiocytami. W celach porównawczych wykonano także standardowe barwienie hematoksyliną i eozyną czyli H&E (Ryc. 70).

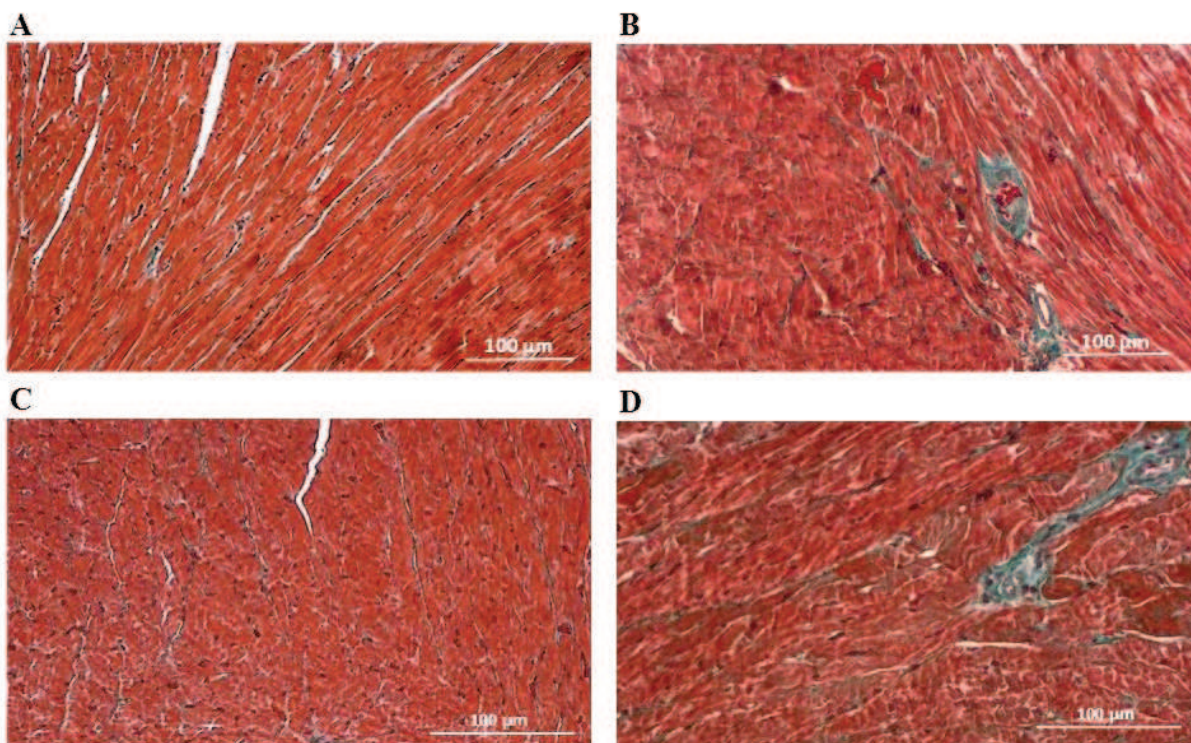
Na Ryc. 71, przedstawiono przekroje podłużne oraz poprzeczne mięśnia sercowego starego szczura kontrolnego w porównaniu do młodego osobnika. Widoczny jest wyraźnie większy udział włókien tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego dwuletniego szczura. Dodatkowo, zaobserwowano, że w barwieniu H&E na przekrojach poprzecznych średnica włókien w mięśni starym szczura była widocznie większa w porównaniu do młodego osobnika w grupie kontrolnej oraz u zwierząt KDR (Ryc. 70).

U zwierząt poddanych 30-dniowej diecie restrykcyjnej (Ryc. 72), widać wyraźnie większy udział włókien tkanki łącznej w sercu dwuletniego niż u młodego szczura, szczególnie w obrębie naczyń małego i dużego kalibru (nie pokazano). Dodatkowo, w sercu młodego szczura KDR, zaobserwowano także zwiększony udział włókien kolagenowych (Ryc. 71, Ryc. 72) oraz niewielkie powiększenie włókien mięśniowych w

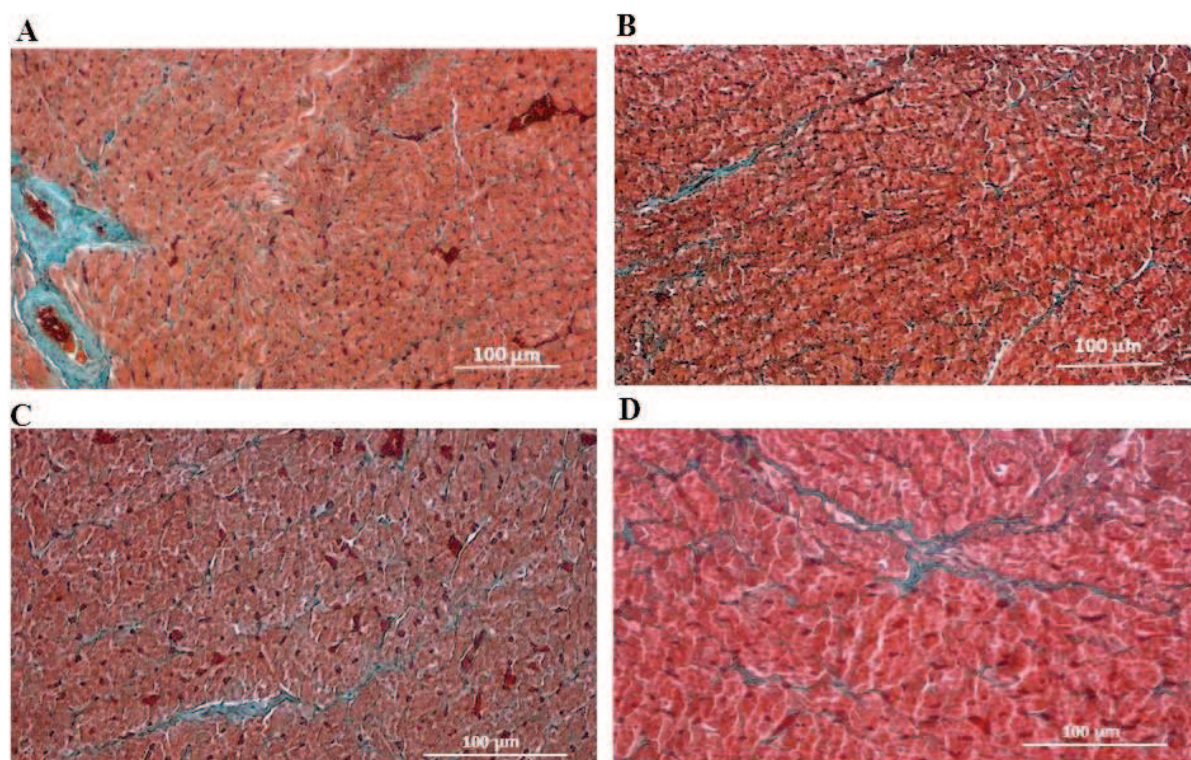
porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 70). U młodych szczurów, którym przywrócono karmienie *ad libitum* przez 2, 4 i 6 dni (Ryc. 73, Ryc. 74, Ryc. 75), stopień zwłóknienia struktury mięśnia sercowego był także wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 71).



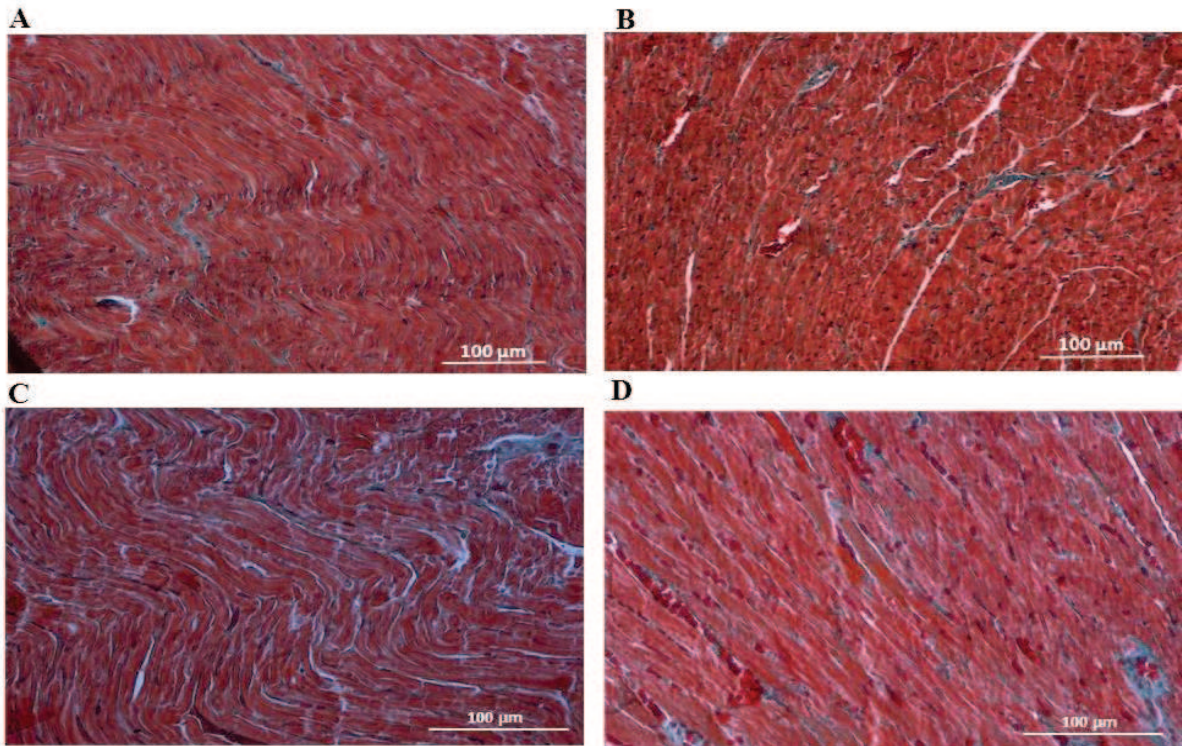
Ryc. 70. Mikrofotografia serca młodych (A, C) i starych szczurów (B, D) kontrolnych oraz poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej. Barwienie hematoksylina i eozyna. Wyraźnie powiększone włókna mięśniowe w strukturze mięśnia sercowego starych zwierząt. Powiększenie x 40.



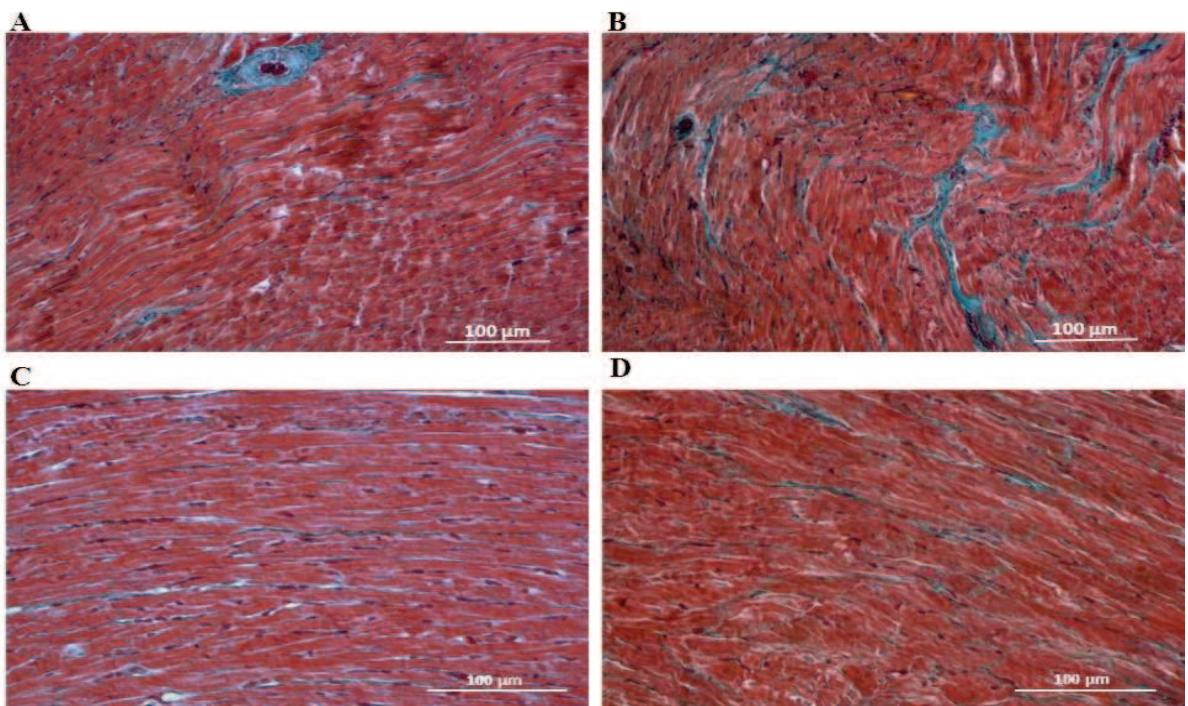
**Ryc. 71. Mikrofotografie serca młodych (A, C) i starych szczurów (B, D) kontrolnych. Barwienie Masson- Goldner. Wyraźnie większy udział włókien tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego starych zwierząt. Powiększenia x100 (A i B) oraz x200 (C i D).**



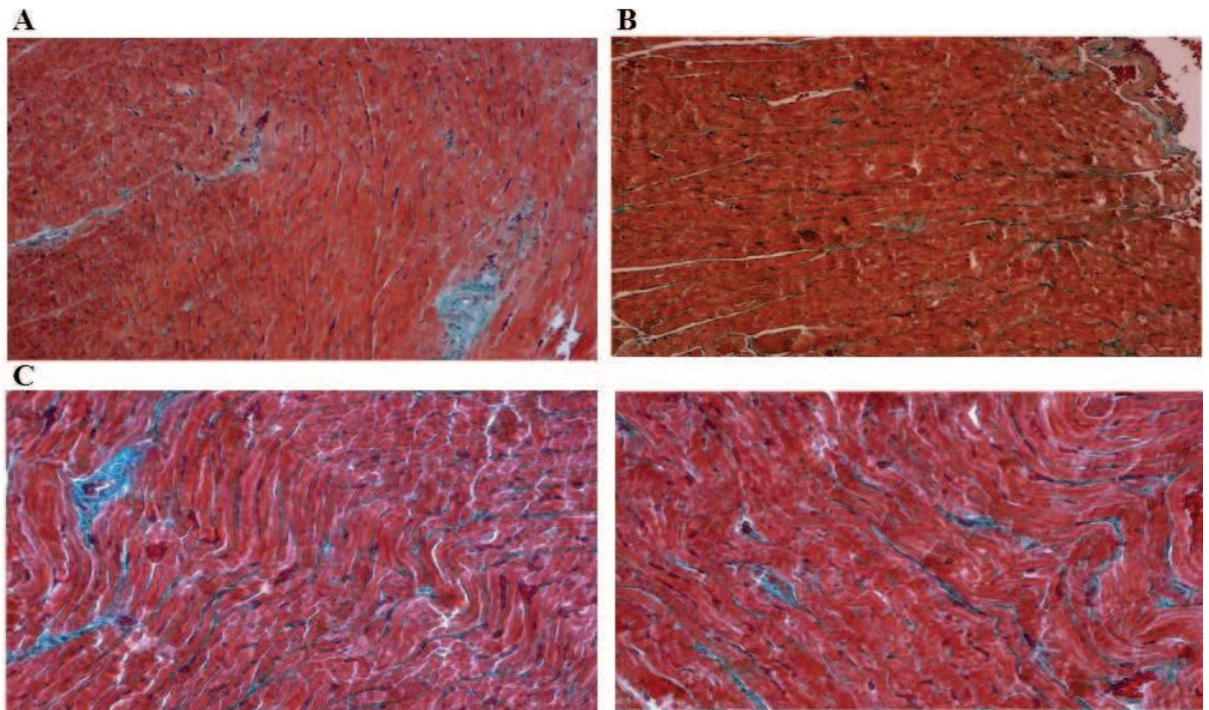
**Ryc. 72. Mikrofotografie serca młodych (A, C) i starych szczurów (B, D) poddanych 30-dniowej diecie restrykcyjnej. Barwienie Masson- Goldner. Wyraźnie większy udział włókien tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego starych zwierząt. Powiększenia x100 (A i B) oraz x200 (C i D).**



Ryc. 73. Mikrofotografie serca młodych (A, C) i starych szczurów (B, D) poddanych 30-dniowej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez 2 dni. Barwienie Masson- Goldner. Wyraźnie większy udział włókien tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego starych zwierząt. Powiększenia x100 (A i B) oraz x200 (C i D).



Ryc. 74. Mikrofotografie serca młodych (A, C) i starych szczurów (B, D) poddanych 30-dniowej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez 4 dni. Barwienie Masson- Goldner. Wyraźnie większy udział włókien tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego starych zwierząt. Powiększenia x100 (A i B) oraz x200 (C i D).



Ryc. 75. Mikrofotografie serca młodych (A, C) i starych szczurów (B, D) poddanych 30-dniowej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* przez 6 dni. Barwienie Masson- Goldner. Wyraźnie większy udział włókien tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego starych zwierząt. Powiększenia x100 (A i B) oraz x200 (C i D).

## 5.11. Podsumowanie najważniejszych wyników badań w modelu krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia *ad libitum*

### 5.11.1 Ekspresja genów sirtuin w sercu oraz mięśniu szkieletowym mieszanym

Podsumowanie wyników ekspresji genów sirtuin 1, 3 i 7 w mięśniu sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i przywróceniu karmieniu *ad libitum* przedstawiono w Tab. 13.

Tab. 13. Zestawienie wyników ekspresji genów *sirtuin 1, 3 i 7* w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej (względem grupy KDR)

Wiek / Dieta	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
<b>SERCE</b>					
<b>Ekspresja <i>Sirt1</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	o 34% < K	o 40% < K	50% < K	= K
<b>Stare</b>	2x > MK	b.z.	b.z. (2x < KDR)	b.z.	b.z. (4x < KDR)
<b>Ekspresja <i>Sirt3</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	3x > K	KDR+2/ 4/ 6 = K		
<b>Stare</b>	S = M	2x > K	KDR+2/ 4/ 6 = K		
<b>Ekspresja <i>Sirt7</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	Nieznamiennie obniżenie o 30%			= K
<b>Stare</b>	2x < MK	2x > K			
<b>MIĘSIEŃ SZKIELETOWY MIESZANY</b>					
<b>Ekspresja <i>Sirt1</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	4x > K	= K	= K (4x < KDR)	= K (4x < KDR)
<b>Stare</b>	2x > MK	1,5x > K	Nieznamiennie 4,5x < K (7x < KDR)		Nieznamiennie < K
<b>Ekspresja <i>Sirt3</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	o 43% < K	= K	o 42% < K	o 72% < K
<b>Stare</b>	1,5x < MK	b.z.	b.z.	b.z.	2x > K (oraz KDR)
<b>Ekspresja <i>Sirt7</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	4x > K	Nieznamiennie 2x > K	= K	= K
<b>Stare</b>	o 36% < MK	o 22% > K	KDR+2/ 4/ 6 = K		

Oznaczenia: **K** – szczury kontrolne, **KDR** – zwierzęta poddane 30-dniowej diecie restrykcyjnej 60%, **KDR+2**, **KDR+4**, **KDR+6** – zwierzęta poddane KDR, a następnie karmione *ad libitum* przez wskazaną liczbę dni. Skróty: **b.z.**- bez zmian względem kontroli w danej grupie wiekowej, **S**- stare szczury, **M**- młode szczury.

### 5.11.2 Ekspresja genów *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta$* w mięśni sercowym oraz mięśni szkieletowym mieszanym

Podsumowanie wyników ekspresji genów *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta$*  w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów poddanych

krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i przywróceniu karmieniu *ad libitum* przedstawiono w Tab. 14.

Tab. 14. Zestawienie wyników ekspresji genów *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$* , *Ppar- $\beta$*  w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej (względem grupy KDR)

Wiek / Dieta	K	KDR	KDR+2	KDR+4	KDR+6
<b>SERCE</b>					
<b>Ekspresja <i>Glut4</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	2x > K	KDR+2/ 4/ 6 = K (2x < KDR)		
<b>Stare</b>	S = M	b.z.			
<b>Ekspresja <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	2x > K	= K (3x < KDR)	= K (4x < KDR)	= K (4,7x < KDR)
<b>Stare</b>	S = M	b.z.	o 43% < K	= K	= K
<b>Ekspresja <i>Ppar-<math>\beta</math></i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	o 25% > K	= K (2x < KDR)	= K (2,8x < KDR)	= K (2,5x < KDR)
<b>Stare</b>	S = M	b.z.			
<b>MIĘSIEŃ SZKIELETOWY MIESZANY</b>					
<b>Ekspresja <i>Glut4</i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	b.z.	R2, R4 stopniowe obniżanie		6,5x < K (KDR)
<b>Stare</b>	2x < MK	2,5x < K	R2, R4 stopniowy wzrost		2x > K (5x > KDR)
<b>Ekspresja <i>Pgc-1<math>\alpha</math></i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	Nieznamienny wzrost o 73%	1,7x < K (3x < KDR)	3x < K (5,6x < KDR)	3x < K (5x < KDR)
<b>Stare</b>	2x < MK	2,5x < K	Powolny wzrost		3,5x > K (10x > KDR)
<b>Ekspresja <i>Ppar-<math>\beta</math></i> na poziomie mRNA</b>					
<b>Młode</b>	1	Nieznamienny wzrost o 71%	Nieznamienne obniżenie o 53% (o 84% < KDR)	o 79% < K (o 88% < KDR)	= K
<b>Stare</b>	S = M	b.z.			

Oznaczenia jak dla Tab. 13.

### 5.11.3 Aktywność i ekspresja palmitoiltransferazy karnitynowej I w sercu oraz mięśni szkieletowym mieszanym

Podsumowanie wyników ekspresji genu *Cpt-1* i jego aktywności enzymatycznej w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej i przywróceniu karmieniu *ad libitum* przez dwa dni przedstawiono w Tab. 15.

Tab. 15. Zestawienie wyników ekspresji genu *Cpt-1* i jego aktywności enzymatycznej w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej (względem grupy KDR)

Wiek / Dieta	K	KDR	KDR+2
<b>SERCE</b>			
<b>Ekspresja <i>Cpt-1</i> na poziomie mRNA</b>			
<b>Młode</b>	1	o 62% > K	o 34% > K
<b>Stare</b>	S = M	o 39% > K	= K
<b>Aktywność CPT-I</b>			
<b>Młode</b>	1	2x > K (o 47% > SKDR)	= K (o 39% < KDR)
<b>Stare</b>	o 54% > MK	b.z.	77% > K (o 143% > KDR)
<b>MIĘSIEŃ SZKIELETOWY MIESZANY</b>			
<b>Ekspresja <i>Cpt-1</i> na poziomie mRNA</b>			
<b>Młode</b>	1	b.z.	o 42% < K (o 35% < KDR)
<b>Stare</b>	2x < MK	b.z. (o 57% < MKDR)	b.z.
<b>Aktywność CPT-I</b>			
<b>Młode</b>	1	o 39% < K	o 72% < K
<b>Stare</b>	S = M	b.z. (2,5x > MKDR)	b.z. (3,4x > MKDR)

Oznaczenia jak dla Tab. 13.



## 6. DYSKUSJA

Obecnie na całym świecie, również i w Polsce, odnotowuje się ciągle wzrost liczebności ludzi starszych, czyli po 65 roku życia oraz ludzi z chorobliwą nadwagą. Otyłość u ludzi, także w podeszłym wieku, stała się jedną z głównych przyczyn przedwczesnej śmiertelności na podłożu chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy i innych zaburzeń zespołu metabolicznego (Unger i wsp. 2010). W związku z tym, obecnie trwają intensywnie poszukiwania najskuteczniejszych metod jej leczenia. Dotychczas najlepszym sposobem terapii otyłości u ludzi jest regularny wysiłek fizyczny, właściwa dieta oraz stosowanie krótkotrwałych głódówek lub tzw. diet nisko- lub bardzo niskokalorycznych w celu szybkiej redukcji masy ciała i niwelacji objawów zespołu metabolicznego (Tsai i Wadden 2006; Gugliucci i wsp. 2009). Tymczasem w piśmiennictwie brak jest podstawowych danych dotyczących wpływu **krótkotrwałej diety restrykcyjnej**, czy głodzenia i ponownego karmienia *ad libitum*, na metabolizm mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych u starych osobników (brak danych u ludzi spowodowany jest oczywiście względami natury etycznej). Z tego względu jednym z celów niniejszej pracy było doświadczalne zweryfikowanie wpływu wskazanych technik żywieniowych na mięsień sercowy i szkieletowy szczurów, co mogłoby być pomocne dla oceny stosowania podobnych technik żywieniowych w leczeniu otyłości u osób zarówno w średnim, jak i podeszłym wieku.

Podstawowym jednak założeniem pracy było wskazanie możliwych zmian w **ekspresji sirtuin 1, 3 i 7** na poziomie mRNA i białka w mięśniach szkieletowych oraz w sercu młodych i starych szczurów w modelu dynamicznych zmian metabolizmu energetycznego wywołanych 30-dniową dietą restrykcyjną lub głodzeniem i przywróceniem karmienia *ad libitum*.

Przeprowadzone badania dostarczyły oryginalnych wyników w części dotyczącej ekspresji sirtuin w sercu i mięśniach szkieletowych w założonych modelach doświadczalnych.

### **6.1. Wpływ głodzenia – karmienia na metabolizm energetyczny mięśni młodych i starych szczurów**

Starzeniu się organizmów towarzyszą zmiany hormonalne i metaboliczne, prowadzące do zaburzeń homeostazy energetycznej. U ludzi, gryzoni oraz innych gatunków ssaków, wyraża się to m.in. zwiększoną akumulacją tkanki tłuszczowej prowadzącą do otyłości oraz zwiększonym ryzykiem wystąpienia objawów zespołu metabolicznego, obejmującego oporność na insulinę, cukrzycę typu 2, miażdżycę oraz nadciśnienie tętnicze, które potencjalnie mogą prowadzić do niewydolności serca (Kmieć i wsp. 2005; Karavidas i wsp. 2010). W niniejszej pracy, w celu ujawnienia możliwych zaburzeń homeostazy energetycznej w starzejących się mięśniach szkieletowych i serca, 4-miesięczne oraz 24-miesięczne szczury poddano stymulacji pokarmowej: dwudniowemu głodzeniu oraz ponownemu karmieniu dietą pełną.

W trakcie głodzenia, czyli w stanie całkowitego deficytu energetycznego, początkowo wykorzystywane są zapasowe substraty energetyczne organizmu. W pierwszej kolejności zużywany jest glikogen gromadzony w wątrobie i mięśniach, maleje tempo glikolizy oraz rośnie tempo glukoneogenezy. Substratami dla ostatniego procesu mogą być glicerol uwalniany z hydrolizy triacylogliceroli lub aminokwasy (np. glutamina), pochodzące z proteolizy białek mięśni szkieletowych. Przy przedłużającym się głodzeniu stopniowo zanika tkanka tłuszczowa, natomiast głównym substratem energetycznym stają się uwalniane z adipocytów kwasy tłuszczowe (Pilegaard i wsp. 2003). W kolejnych etapach głodzenia zmniejsza się także masa innych narządów i tkanek, w tym masa mięśni szkieletowych i serca (Johnstone 2007).

W pierwszym z podjętych modeli doświadczalnych dwudobowe głodzenie samców szczura spowodowało mobilizację zgromadzonych przez nich zapasów energetycznych, nie doprowadzając do degradacji tkanek mięśniowych. Przede wszystkim, świadczy o tym stałe stężenie mocznika i białka całkowitego w surowicy krwi młodych i starych szczurów na wszystkich etapach doświadczenia, co wskazuje na wyrównany bilans azotowy w organizmie tych zwierząt. Wpływ wieku wyraził się w niższym stężeniu mocznika i albuminy oraz wyższym stężeniu białka całkowitego w surowicy krwi starych szczurów w porównaniu do młodych osobników. Podobne różnice zależne od wieku zaobserwowali również Moustafa (1997) oraz Nistiar i wsp. (2012), jednak fizjologiczne podstawy tego zjawiska są nadal niewyjaśnione.

W stanach całkowitego deficytu energetycznego uruchamiane są szczególne mechanizmy adaptacyjne skierowane na pokrycie zapotrzebowania energetycznego mózgu i innych tkanek. Główną rolę w tych procesach ma aktywacja odpowiednich hormonów

(przede wszystkim insuliny, glukokortykosterydów i leptyny) oraz mobilizacja takich zapasowych substratów energetycznych jak glikogen i triacyloglicerole (TG).

W przedstawionych badaniach w surowicy krwi starych kontrolnych szczurów zaobserwowano większe stężenie TG w porównaniu do młodych zwierząt, co stwierdzono także we wcześniejszych pracach (Kmieć i wsp. 2005; Kim i wsp. 2009). Podobne zjawisko występuje również wraz z rosnącym wiekiem u znacznej części społeczeństwa. Pod wpływem głodzenia TG zgromadzone w tkance tłuszczowej ulegają hydrolizie i w postaci wolnych kwasów tłuszczowych dostarczane są do tkanek mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego i wątroby, jako ich główny substrat energetyczny. W typowej odpowiedzi metabolicznej na głodzenie obserwuje się zatem obniżenie stężenia TG, obniżenie sekrecji insuliny i wzrost stężenia WKT we krwi. Z kolei w momencie przywrócenia diety pełnej (*refeeding*) reakcja organizmu powinna być odwrotna. W przeprowadzonym eksperymencie głodzenie przez 48 godzin spowodowało obniżenie stężenia TG i wzrost stężenia WKT tylko w surowicy krwi młodych szczurów względem grupy kontrolnej, co zaobserwowano także we wcześniejszych badaniach naszego zespołu (Kmieć i wsp. 2005). Natomiast w surowicy krwi starych szczurów z grupy kontrolnej zanotowano wysokie stężenie TG oraz WKT w porównaniu do młodych zwierząt, co wykazali także inni autorzy (Kim i wsp. 2009). Obserwacja ta sugeruje zmniejszony wychwyty i wewnątrzkomórkowe przemiany WKT, które w pewnym stopniu mogą wynikać z obniżającej się z wiekiem masy mięśniowej oraz obniżeniem aktywności lipogennej tkanki tłuszczowej starych szczurów (Toth i Tcherno 2000; Swierczyński 2006; Zhu i wsp. 2007). Potwierdzeniem tego mógłby być fakt, że u dwuletnich zwierząt stężenie TG w surowicy krwi wzrosło w ostatnim dniu karmienia dietą pełną, czyli o dwa dni później niż u młodych. Z kolei brak istotnych zmian w stężeniu TG i WKT w surowicy krwi starych szczurów w warunkach głodzenia może wskazywać na zaburzenia procesu mobilizacji tłuszczów w trakcie starzenia (Linford i wsp. 2007; Zhu i wsp. 2007; Valle i wsp. 2010). Z drugiej jednak strony obserwacja ta mogłaby także świadczyć o tym, że podwyższony poziom WKT we krwi starych szczurów był wystarczający na pokrycie zapotrzebowania energetycznego tkanek w trakcie dwudniowego głodzenia. To z kolei mogłoby sugerować, że problem nie tkwi w samym procesie starzenia, lecz w kompozycji ciała dwuletnich szczurów, wyrażającej się m.in. nadmiarem tkanki tłuszczowej (Coon i wsp. 1992; Boden i wsp. 1997; Basu i wsp. 2003; Chung i wsp. 2013).

W surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych zmierzono także stężenie cholesterolu i cholesterolu frakcji HDL (Ch-HDL). Ch-HDL jest zaangażowany w transport nadmiaru cholesterolu z tkanek obwodowych do wątroby, gdzie ulega degradacji, co sprzyja zmniejszeniu ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych. Podobnie jak w przypadku TG i WKT stężenie cholesterolu i Ch-HDL było wyższe w surowicy krwi starych niż młodych szczurów kontrolnych, co zaobserwowano także w trakcie starzenia się ludzi (de Heredia i wsp. 2008; Kim i wsp. 2009; Ghezzi i wsp. 2012). Być może zjawisko to spowodowane jest obniżoną u starych osób aktywnością 7 $\alpha$ -hydroksylazy cholesterolowej, odpowiedzialnej za wytwarzanie kwasów żółciowych i usuwanie nadmiaru cholesterolu z organizmu (Einarsson i wsp. 1985; Ståhlberg i wsp. 1991; Parini i wsp. 1999). W warunkach przeprowadzonego doświadczenia u szczurów z obu grup wiekowych głodzenie przez dwa dni oraz przywrócenie karmienia dietą pełną nie miało wpływu na średnie stężenie ChC i Ch-HDL w porównaniu do grup kontrolnych.

W podsumowaniu można stwierdzić, że brak zmian stężeń TG i WKT w surowicy krwi starych szczurów w warunkach głodzenia przez 2 doby i następującego karmienia może wskazywać na zaburzenia procesu mobilizacji tłuszczów w trakcie starzenia.

### **6.1.1 Pośrednia ocena insulinowrażliwości mięśni szczurów głodzonych – karmionych w zależności od wieku zwierząt**

W przedstawionej pracy dokonano próby pośredniego zbadania insulinowrażliwości tkanek mięśniowych, określając średnie stężenie glukozy i insuliny w surowicy krwi młodych i starych szczurów oraz analizując ekspresję genu insulinozależnego, mięśniowego transportera glukozy 4 (*Glut4*). Oporność na insulinę oznacza, iż komórki docelowe nie reagują właściwie na prawidłowe, lub zwiększone ilości insuliny krążącej we krwi. Dodatkowo, pomimo obecności hormonu wychwyty glukozy i jej wykorzystanie przez komórki wątroby, adipocyty, czy komórki mięśniowe, są upośledzone.

W pracy wykazano, że w warunkach podstawowych oraz pod wpływem głodzenia i następującego karmienia *ad libitum* stężenie glukozy i insuliny we krwi było porównywalne u młodych i starych zwierząt. To z kolei mogłoby sugerować, że metabolizm glukozy u starych szczurów był w granicach normy, a ich tkanki nie były insulinooporne.

Należy jednak podkreślić, że część autorów (Carrascosa i wsp. 2011; De Solís i wsp. 2012) zaobserwowała, że u szczurów rasy Wistar oporność na insulinę może się rozwijać w trakcie starzenia bez znaczących różnic w stężeniu glukozy i insuliny w surowicy krwi, co ujawnia się m.in. w warunkach głodzenia (Zanquetta i wsp. 2006). Hipotezę tę potwierdzają częściowo własne wyniki wskazujące na istnienie różnic w ekspresji genu *Glut4* między młodymi a starymi szczurami w reakcji na 48-godzinne głodzenie oraz następujące karmienie dietą pełną.

Przede wszystkim ekspresja genu *Glut4* była istotnie wyższa w mięśniu szkieletowym mieszanym kontrolnych młodych szczurów niż u starych zwierząt, co obserwowano także u innych ras szczurów na poziomie białka (Lin i wsp. 1991; Larkin i wsp. 2001) oraz w mięśniu obszernym bocznym uda ludzi starszych (Houmard i wsp. 1995). Obniżona ekspresja transportera glukozy w mięśniach starych szczurów w połączeniu z wysokim stężeniem WKT w ich surowicy, co uważa się za jedną z głównych przyczyn zaburzonego wychwytu i fosforylacji glukozy w mięśniach (Boden 1997 i 2003), może sugerować obniżoną insulinowrażliwość i wychwyt glukozy w mięśniu szkieletowym mieszanym starych szczurów (Larkin i wsp. 2001).

Zależne od wieku różnice zaobserwowano także w ekspresji *Glut4* w trakcie głodzenia: ulegała ona obniżeniu w MSM młodych szczurów (podobnie jak w mięśniu bocznym uda ludzi głodzonych przez 48 godzin (Norton i wsp. 2007)) i nie zmieniała się w mięśniu starych zwierząt. Z kolei przywrócenie karmienia *ad libitum* spowodowało wzrost ekspresji genu transportera glukozy 4 u starych szczurów i brak zmiany wobec grupy głodzonej u młodych zwierząt. Uzyskane dane sugerują więc pośrednio możliwość wystąpienia zaburzeń w mięśniowym transporcie glukozy i obniżoną insulinowrażliwość starych zwierząt.

Część autorów uważa, że główną przyczyną obniżenia insulinowrażliwości tkanek obwodowych, w tym mięśni, jest zwiększona zawartość wewnątrzbrzuszej tkanki tłuszczowej, a nie proces starzenia jako takiego (*per se*) (Coon i wsp. 1992; Boden i wsp. 1997; Basu i wsp. 2003; Escrivá i wsp. 2007). W przeprowadzonym eksperymencie dwuletnie szczury miały istotnie większą masę ciała oraz zwiększoną masę tkanki tłuszczowej niż młode osobniki (Wrońska i wsp. 2014). Dodatkowo, dwudniowe głodzenie nie wywołało zmian ekspresji genu *Glut4* w mięśniu szkieletowym mieszanym starych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej, co może sugerować pewne zaburzenia w mięśniowym transporcie glukozy i obniżoną insulinowrażliwość starych zwierząt. Z kolei,

podczas karmienia *ad libitum* zaobserwowano stopniowy wzrost poziomu mRNA *Glut4*, co wskazywałoby na poprawę reakcji transportera na przywrócenie podstawowego stężenia insuliny w surowicy krwi. Ponadto, można by stwierdzić, że dwudniowe głodzenie, które spowodowało prawie 6% zmniejszenie masy ciała starych szczurów, mogłoby mieć istotne znaczenie w poprawie insulinowrażliwości mięśni (Goodpaster i wsp. 1999).

Aktualnie w piśmiennictwie brakuje prac dotyczących ekspresji genu *Glut4* w mięśniu sercowym starych szczurów. W przedstawionych badaniach własnych w sercu szczura nie zaobserwowano różnic w poziomie mRNA *Glut4* między osobnikami młodymi i starymi z grup kontrolnych, co stwierdzili także na poziomie białka GLUT4 Wang i wsp. (1997). Z kolei w badaniach Cartee (1993) stwierdzono, że w lewej komorze serca szczurów rasy Fischer 344/Brown Norway poziom GLUT-4 obniżył się o około 30% między osobnikami 3,5- a 25-miesięcznymi. Rozbieżności w otrzymanych wynikach mogą wynikać z różnic genetycznych między rasami szczura oraz innych fragmentach serca pobranych do badań.

W badaniach własnych, zaobserwowano natomiast zależne od wieku różnice w ekspresji genu *Glut4* w odpowiedzi na dwudniowe głodzenie. W mięśniu sercowym młodych szczurów poziom mRNA *Glut4* podczas głodzenia wzrósł prawie 4-krotnie w porównaniu do grupy kontrolnej i uległ stopniowemu obniżeniu w trakcie przywrócenia diety pełnej. W sercach starych szczurów, ani głodzenie ani przywrócenie karmienia *ad libitum* nie wpłynęło na ekspresję genu *Glut4*. Otrzymane wyniki nie korespondują z danymi przedstawionymi przez innych autorów, którzy zaobserwowali, że pod wpływem głodzenia poziom mRNA *Glut4* (oceniany metodą Northern blotting) ulega obniżeniu w mięśniu sercowym młodych szczurów rasy Wistar (Camps i wsp. 1992; Kraegen i wsp. 1993). Rozbieżności w przedstawionych wynikach mogą wynikać z różnic metodycznych w ocenie poziomu mRNA *Glut4* (w badaniach własnych zastosowano metody RT-qPCR), z różnic międzyosobniczych zwierząt, czy czasu trwania głodzenia.

Uzyskane wyniki mogą sugerować zmniejszoną insulinowrażliwość mięśnia sercowego i szkieletowego starych szczurów.

### **6.1.2 Leptynooporność i metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśniach szczurów głodzonych – karmionych**

Leptyna jest jednym z najważniejszych hormonów regulujących metabolizm energetyczny ssaków. Uwalniana do krwi dociera z krążeniem do mózgu, gdzie wiąże się ze swoimi receptorami w podwzgórzu i prowadzi do obniżenia łaknienia, zmniejszenia spożycia pokarmu, a także do obniżenia masy tkanki tłuszczowej i zwiększenia ilości wydatkowanej energii (Gogga i wsp. 2011; Keung i wsp. 2011). U ssaków głównym źródłem leptyny są dojrzałe adipocyty białej tkanki tłuszczowej (WAT, ang. *white adipose tissue*), a jej biosynteza i wydzielanie zależy od masy WAT (Zhang i wsp. 2002). Świadczą o tym także własne wyniki, ponieważ stężenie leptyny w surowicy krwi dodatnio korelowało z masą ciała młodych ( $r= 0.67$ ,  $p= 10^{-6}$ ) oraz starych szczurów ( $r= 0.51$ ,  $p= 0,0019$ ). Wyraźnie wyższy poziom leptyny w surowicy starych szczurów zaobserwowali też inni badacze (Kmieć i wsp. 2005; Li i wsp. 1997; Fernandez-Galaz i wsp. 2002). Pomimo tego, u starych szczurów nie obserwowano efektów działania leptyny, polegających na obniżaniu łaknienia czy zmniejszaniu masy ciała. To zjawisko, często obserwowane u otyłych ludzi i gryzoni, określa się jako leptynooporność, która może być spowodowana m.in. obniżonym transportem leptyny przez barierę krew- mózg, czy zaburzeniami w szlakach sygnałowania hormonu w podwzgórzu (Wang i wsp. 2001; Amitani i wsp. 2013). Ponadto, hiperleptynemia powoduje zaburzenia transdukcji sygnałowania insuliny, przyczyniając się do insulinooporności u starszych zwierząt (Perez i wsp. 2004) oraz niekorzystnej akumulacji lipidów w tkankach obwodowych (Wang i wsp. 2008). W konsekwencji leptynooporności, pomimo farmakologicznych czy behawioralnych metod leczenia otyłości, efekt redukcji masy ciała jest krótkotrwały i najczęściej prowadzi do szybkiego powrotu do masy sprzed diety, co zaobserwowano także u badanych dwuletnich szczurów (Yanovski i Yanovski 2002).

W trakcie głodzenia uruchamiany jest mechanizm adaptacyjny ukierunkowany na ograniczenie wydatkowania energii, którego elementem jest obniżenie poziomu leptyny. W badaniach własnych zaobserwowano, że 48-godzinne głodzenie obniżyło stężenie leptyny o 69% u młodych i o 47% u starych szczurów, co wykazano także w innych badaniach u szczura i człowieka (Boden i wsp. 1996; Kolaczynski i wsp. 1996; Marzolo i wsp. 2000; Kmieć i wsp. 2005). Po przywróceniu karmienia *ad libitum*, już w drugim dniu stężenie leptyny wzrosło u starych, ale nie u młodych szczurów i utrzymało się na wysokim poziomie do końca karmienia dietą pełną. Różnice te mogły wynikać z mniejszej redukcji masy ciała starych zwierząt w warunkach głodzenia oraz ogólnie większego stężenia podstawowego leptyny u dwuletnich szczurów.

Ostatnio wykazano, że ekspresja genu kodującego receptor leptyny w mięśniach szkieletowych jest większa niż w pozostałych tkankach obwodowych, co wskazuje, że mięśnie mogą być głównym efektem działania hormonu (Akasaka i wsp. 2010). Zaobserwowano także, że w sercu i mięśniach szkieletowych gryzoni, leptyna promuje utlenianie kwasów tłuszczowych (Atkinson i wsp. 2002; Minokoshi i wsp. 2002), zmniejszając tym samym wewnątrzmięśniową akumulację TG i poprawiając wrażliwość mięśni na działanie insuliny (Wang i wsp. 2008). Steinberg i wsp. (2002), wykazali, że leptyna zwiększa beta-oksydację kwasów tłuszczowych, ale tylko w mięśniu prostym brzucha ludzi szczupłych, ale nie otyłych, u których najprawdopodobniej wystąpiły objawy leptynooporności.

Z badań przeprowadzonych *in vitro* na hodowlach mysich miocytów wynika, że leptyna stymuluje utlenianie kwasów tłuszczowych w mięśniu szkieletowym poprzez indukcję genów kodujących m.in. palmitoilotransferazę karnitynową-I (CPT-I) (Akasaka i wsp. 2009). CPT-I odgrywa kluczową rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego transportu i metabolizmu wolnych kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych i serca (Park i Cook 1998; Eaton i wsp. 2001; Liu i wsp. 2007). Wpływ głodzenia i następującego karmienia *ad libitum* na aktywność i ekspresję genu *Cpt-I* w sercu i mięśniu szkieletowym starych szczurów, nie był dotychczas badany.

W badaniach własnych nie zaobserwowano różnic w aktywności CPT-I w mięśniu szkieletowym mieszanym starych kontrolnych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt. W sercu natomiast, aktywność enzymu była o 54% wyższa u starych kontrolnych szczurów niż u młodych zwierząt, choć wynik ten był na granicy istotności statystycznej ( $p=0,06$ ). Otrzymane wyniki są zgodne z innymi badaniami, przeprowadzonymi na mitochondriach izolowanych z serca młodych i starych szczurów (Hansford 1978), mięśnia brzuchatego łydki młodych - dojrzałych szczurów (Park i wsp. 2006) oraz na ludzkim mięśniu skośnym wewnętrznym brzucha (Kaczor i wsp. 2006). Autorzy tej ostatniej pracy zaobserwowali, że w badanym mięśniu aktywność CPT-I wyrażona w stosunku do ogólnej ilości białka wyizolowanego z tkanki, nie różniła się między ludźmi w średnim wieku (29-54 lat) a osobnikami starszymi (61-74 lat).

Z drugiej strony, otrzymane wyniki są niezgodne z danymi innych autorów, którzy wykazali, że wraz z wiekiem aktywność CPT-I zmniejsza się w mięśniu sercowym (McMillin i wsp. 1993; Odiet i wsp. 1995; Paradies i wsp. 1995; Lee i wsp. 2002; Gómez i wsp. 2012) i mięśniach szkieletowych mieszanych starych szczurów (Kim i wsp. 2009).



Rozbieżności w przedstawionych wynikach mogą być związane z różnicami genetycznymi między szczepami szczura, aktywnością ruchową zwierząt podczas restrykcji kalorycznej, czy też składem diety. Dodatkowo, istotnym czynnikiem rozbieżności może być także zastosowana metoda pomiaru aktywności enzymu. W niniejszej pracy aktywność CPT-I mierzono w homogenatch mięśniowych (podobnie jak w pracy Kaczor i wsp. 2006), a nie jak w pozostałych wymienionych publikacjach w izolowanych z mięśni mitochondriach.

W badanym modelu doświadczalnym zaobserwowano istotne różnice między ekspresją genu *Cpt-I* na poziomie mRNA, a omówionymi powyżej zmianami w aktywności enzymatycznej. W mięśniu sercowym kontrolnych zwierząt nie wystąpiły zależne od wieku różnice w poziomie mRNA *Cpt-I*, jednak głodzenie i dwudniowe karmienie *ad libitum* dwukrotnie zwiększały poziom mRNA *Cpt-I* w sercu młodych, ale nie starych zwierząt. Podobne wyniki w mięśniu sercowym 6-tygodniowych szczurów Sprague-Dawley uzyskali także Van der Lee i wsp. (2001).

Zupełnie inną sytuację zaobserwowano w przypadku mięśnia szkieletowego mieszanego. Poziom mRNA *Cpt-I* był ponad 2-krotnie wyższy u młodych kontrolnych szczurów niż u starych zwierząt, choć aktywność enzymu była podobna u zwierząt z obu grup wiekowych. Wynik ten odbiega od danych przedstawionych przez Kim i wsp. (2009), którzy zanotowali podobny poziom mRNA *Cpt-I* w mięśniu brzuchatym łydki (*m. gastrocnemius*) kontrolnych młodych i starych szczurów rasy Fisher 344 przy obniżonej o około 20% aktywności enzymu w grupie starych zwierząt. Rozbieżności w przedstawionych wynikach mogą być związane z różnicami między szczepami szczura, a także wynikać z różnic w kompozycji włókien badanego mięśnia. W pracy badano mięsień szkieletowy pobierany z okolic mięśnia obszernego bocznego uda, który w przeciwieństwie do mięśnia brzuchatego łydki zawiera mniej więcej stałą proporcję włókien typu I oraz IIa i IIx na całej długości mięśnia. Z kolei mięsień brzuchaty łydki może zawierać więcej włókien oksydacyjnych lub glikolitycznych w zależności od miejsca pobrania tkanki (De Ruiter i wsp. 1996).

Głodzenie stanowi sygnał do przekierowania metabolizmu energetycznego głównie w mięśniach szkieletowych (ale także w wątrobie, tkance tłuszczowej i mięśniu serca), w kierunku zmiany wykorzystania substratów energetycznych z węglowodanów na wolne kwasy tłuszczowe, a przy przedłużającej się głodówce, także na aminokwasy pochodzące z proteolizy białek mięśni (Jaromowska i Górski 1985; Pilegaard i wsp. 2003).

Zgodnie z oczekiwaniami oraz wynikami innych autorów (Pilegaard i wsp. 2003; Frier i wsp. 2011), zaobserwowano tendencję wzrostu ekspresji genu *Cpt-I* i aktywności enzymu w mięśni szkieletowym młodych szczurów w czasie głodzenia i obniżenie w momencie przywrócenia diety pełnej.

Odminną sytuację zanotowano z kolei u dwuletnich szczurów. Dwudobowe głodzenie nie wpłynęło na ekspresję genu *Cpt-I*, podczas gdy przywrócenie karmienia *ad libitum* spowodowało jego wzrost. Aktywność CPT-I w mięśni szkieletowym starych szczurów także nie uległa zmianom. Są to oryginalne obserwacje nie mające swoich odnośników w badaniach innych autorów.

W związku z tym, że brakuje danych na temat ekspresji genu *Cpt-I* oraz aktywności enzymu w mięśni sercowym starych szczurów w czasie głodzenia i następującego karmienia przez dwie doby, trudno jest jednoznacznie zinterpretować otrzymane wyniki. Biorąc pod uwagę fakt, że mięsień sercowy ma ograniczoną zdolność wewnątrzkomórkowego gromadzenia kwasów tłuszczowych, substraty te muszą być dostarczane z krwią (Liepinsh i wsp. 2014). Z drugiej strony, w trakcie starzenia szczurów i ludzi dochodzi do zwiększonej akumulacji lipidów w kardiomiocytach, co może zaburzać procesy wychwytu i utylizacji kwasów tłuszczowych (Kates i wsp. 2003; van der Meer i wsp. 2008) i mogłoby się uwidocznić w momencie manipulacji żywieniowych. Chociaż po 2 dobach głodzenia stężenie WKT w surowicy krwi starych szczurów było podwyższone, a stężenie insuliny obniżone w stosunku do grupy kontrolnej, to jednak aktywność CPT-I w sercu starych zwierząt nie uległa zmianie ani wskutek głodzenia ani przywrócenia diety pełnej. Wyniki te mogą sugerować, że 48 godzinne głodzenie jest niewystarczającym stymulatorem aktywności CPT-I w sercach starych szczurów rasy Wistar. Z drugiej strony, mogą także w sposób pośredni potwierdzać przypuszczenie o zaburzonym transporcie kwasów tłuszczowych i prawdopodobnie ich  $\beta$ -oksydacji w sercach starych szczurów (Tucker i Turcotte 2002). Trudno jest jednak jednoznacznie stwierdzić, czy uzyskane wyniki są rezultatem procesów starzenia jako takich (*per se*), czy może innych czynników, jak otyłość i oporność na leptynę starych szczurów, brak ruchliwości zwierząt lub wszystkich procesów jednocześnie.

## **6.2. Wpływ głodzenia – karmienia na ekspresję sirtuin w mięśni sercowym oraz szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów w kontekście zmian ekspresji genów regulatorów metabolizmu energetycznego**

### 6.2.1 Ekspresja sirtuiny 1

Jednym z najlepiej poznanych członków rodziny SIRT jest sirtuina 1. Jej kluczową rolę w prawidłowym rozwoju wykazano u genetycznie zmodyfikowanych myszy. Zaobserwowano, że 90% myszy pozbawionych funkcjonalnej postaci *Sirt1* (tzw. *knock-out*, delecja egzonu 4 *Sirt1*) umierało w trakcie rozwoju embrionalnego lub w okresie okołoporodowym, natomiast osobniki, które przeżyły, były mniejsze, rozwijały się powoli oraz wykazywały zaburzenia w morfogenezie oczu i mięśnia sercowego (Cheng i wsp. 2003; Ou i wsp. 2011). Dotychczas jednak jej ekspresja na poziomie mRNA w sercu i mięśni szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów Wistar-Han poddanych głodzeniu i następującemu karmieniu *ad libitum* nie były jeszcze badane.

Braidy i wsp. (2011) wykazali, że na poziomie białka ekspresja SIRT1 w sercach 24-miesięcznych samic szczura Wistar wzrasta, ale jej aktywność enzymatyczna istotnie maleje w porównaniu do 3-miesięcznych zwierząt, głównie wskutek obniżenia poziomu dostępnego koenzymu NAD<sup>+</sup>. Uzyskane własne wyniki korespondują z tą obserwacją, ponieważ ekspresja genu *Sirt1* na poziomie mRNA była wyższa w mięśni sercowym starych szczurów kontrolnych w porównaniu do młodych zwierząt. Wzrost ekspresji genu *Sirt1* w trakcie starzenia może być wyrazem procesu adaptacyjnego związanego z kardioprotekcyjną rolą sirtuiny 1, którą wykazano u transgenicznych myszy (Alcendor i wsp. 2007; Hsu i wsp. 2008; Tong i wsp. 2013). W ich sercach, gdy wywołano wysoką (12-krotną) nadekspresję *Sirt1* pojawiła się hipertrofia mięśnia sercowego, zaburzenia w funkcjonowaniu oraz zwiększona apoptoza kardiomiocytów, czyli zmiany często obserwowane w trakcie starzenia (Alcendor i wsp. 2007; Li i wsp. 2009). Tymczasem niska i umiarkowana (2,5-7,5-krotna) nadekspresja *Sirt1* redukowała negatywny wpływ stresu oksydacyjnego oraz hamowała apoptozę kardiomiocytów (Alcendor i wsp. 2004; Hsu i wsp. 2008).

Własne wyniki wskazują także na odmienny efekt dwudniowego głodzenia na ekspresję *Sirt1* w mięśni sercowym młodych i starych szczurów, ponieważ nie spowodowało ono zmian u młodych osobników, natomiast silnie obniżyło poziom mRNA *Sirt1* w sercu starych zwierząt. U 5- miesięcznych zwierząt 48-godzinne głodzenie nie wywołało istotnych zmian w poziomie mRNA *Sirt1*. Z kolei przywrócenie diety pełnej wyraziło się tendencją do stopniowego obniżenie ekspresji sirtuiny w sercu młodych

szczurów względem grupy głodzonej i brak zmian wobec grupy głodzonej w sercu starych zwierząt. Dodatkowo, w mięśniu sercowym młodych i starych szczurów głodzonych ekspresja *Sirt1* była pozytywnie skorelowana z ekspresją genów *Sirt3*, *Glut4* oraz *Cpt-1*. Uzyskane wyniki mają charakter oryginalny, ponieważ wpływ wieku i głodzenia – karmienia na ekspresję *Sirt1* w mięśniu sercowym ssaków nie był wcześniej przedmiotem badań.

W mięśniu szkieletowym, podobnie jak w sercu, poziom mRNA *Sirt1* był wyższy u starych kontrolnych szczurów niż u młodych zwierząt. Obserwacja ta pośrednio potwierdza wyniki pracy Koltai i wsp. (2010), którzy zaobserwowali dwukrotnie wyższy poziom białka SIRT1 w mięśniu brzuchatym łydki 26-miesięcznych szczurów Wistar w porównaniu do 3- miesięcznych zwierząt. Warto podkreślić, że we wspomnianej pracy stwierdzono dużo niższą aktywność sirtuiny 1 niż u młodych zwierząt, co sugerowałoby wzrost ilości nieaktywnej lub mało aktywnej postaci SIRT1 w trakcie starzenia. Podwyższona ekspresja SIRT1 w tkance mięśniowej starych szczurów może być wyrazem mechanizmów kompensujących obniżenie poziomu  $\text{NAD}^+$  o około 36% (spowodowany m.in. zmniejszeniem ilości NAMPT - enzymu szlaku biosyntezy  $\text{NAD}^+$ ), który zaobserwowano w mięśniu szkieletowym starych szczurów (Koltai i wsp. 2010). W badaniach własnych, choć nie oznaczano aktywności SIRT1 ani poziomu  $\text{NAD}^+$  w mięśniach, otrzymane wyniki wydają się wspierać hipotezę Koltai i wsp (2010). Świadczą o tym dane otrzymane z ekspresji mRNA *Sirt1* w trakcie manipulacji pokarmowych.

Dwudniowe głodzenie obniżyło poziom mRNA o połowę w obydwu grupach wiekowych (wynik na granicy znamienności statystycznej w mięśniu starych szczurów), który powrócił do wartości kontrolnych dopiero po 6 dniach karmienia. Wydaje się, że wpływ głodzenia na ekspresję *Sirt1* może być mięśniowo i gatunkowo specyficzny oraz zależeć od czasu trwania głodzenia, ponieważ w mięśniu szkieletowym młodych myszy całonocne głodzenie (około 15 godzin) spowodowało wzrost ekspresji *Sirt1* (Nemoto i wsp. 2004) lub brak zmian przy 24-godzinnym głodzeniu (Kanfi i wsp. 2008), przy czym w tej ostatniej pracy wykazano wzrost poziomu białka SIRT1.

Negatywny wpływ głodzenia na ekspresję *Sirt1* zdają się potwierdzać wyniki analizy korelacji innych badanych genów. W mięśniu szkieletowym młodych głodzonych szczurów obniżenie ekspresji *Sirt1* było pozytywnie skorelowane z ekspresją *Sirt7*, *Glut4* oraz *Cpt-1*, których to poziom mRNA zmniejszył się lub nie uległ zmianie, jak w przypadku *Cpt-1*. W związku z tym, w trakcie głodzenia w mięśniu szkieletowym młodych

szczurów SIRT1 (możliwe, że we współpracy z SIRT7) może być zaangażowana w regulację metabolizmu przez hamowanie ekspresji genów, kodujących podstawowe białka wychwyty substratów energetycznych (*Glut4* i *Cpt-1*), przy czym brak korelacji (z wyjątkiem *Sirt7*) w mięśni szkieletowym starych zwierząt wydaje się świadczyć o zaburzeniu tych zależności regulacyjnych w trakcie starzenia.

W podsumowaniu można stwierdzić, że w trakcie starzenia ekspresja genu *Sirt1* wzrasta w mięśni sercowym i szkieletowym mieszanym szczura. Zmiany w poziomie mRNA *Sirt1* zależne od wieku i od rodzaju badanej tkanki mięśniowej zaobserwowano także po wpływie głodzenia oraz następującego po nim karmienia.

### 6.2.2 Ekspresja sirtuiny 3

Wyniki otrzymane z pomiaru ekspresji sirtuiny 3 w mięśniach wskazują na pewne rozbieżności między ekspresją sirtuiny na poziomie mRNA i białka. Zaobserwowano, że poziom białka referencyjnego (GAPDH) nie był jednakowy we wszystkich analizowanych próbach, co mogło mieć wpływ na ostateczne wyniki względnej zawartości białka SIRT3. Jednak na etapie prowadzenia doświadczeń nie znaleziono informacji, aby poziom GAPDH ulegał zmianie u szczurów rasy Wistar-Han pod wpływem starzenia czy manipulacji pokarmowych, stąd jego zastosowanie jako białka referencyjnego w niniejszej pracy. Mimo tego, w celu osiągnięcia większej przejrzystości analizowanych rezultatów, w obu modelach doświadczalnych dyskutowane wyniki pomiaru ekspresji będą się odnosiły jedynie do zmian poziomu mRNA *Sirt3* w mięśniach młodych i starych szczurów.

Liczne dane literaturowych wskazują, że sirtuina 3 pełni istotną rolę w procesach starzenia oraz regulacji metabolizmu energetycznego mięśni ludzi i zwierząt (Bellizzi i wsp. 2005; Sundaresan i wsp. 2009; Joseph i wsp. 2012).

W mitochondriach jednym z mechanizmów regulacji szlaków metabolicznych jest acetylacja reszt lizyny białek w nich uczestniczących. W związku z tym, uważa się, że mitochondrialna SIRT3 jako deacetylaza zależna od  $\text{NAD}^+$ , może być zaangażowana w regulację przemian energetycznych zachodzących w tym organellum (Lombard i wsp. 2007; Ahn i wsp. 2008). Zwłaszcza, że według najnowszych doniesień SIRT3 pełni istotną funkcję w procesach adaptacyjnych mięśni do stresu metabolicznego wywołanego manipulacjami pokarmowymi, jak karmienie wysokotłuszczową dietą, czy głodzenie i

dieta restrykcyjna, kiedy to dochodzi do zmian potencjału oksydoredukcyjnego komórek (Hirschey i wsp. 2010; Qiu i wsp. 2010; Shimazu i wsp. 2010). W konsekwencji prowadzi to do zmiany stosunku  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  w kierunku zwiększenia się puli cząsteczek koenzymu  $\text{NAD}^+$  i aktywacji SIRT3 (Lin i wsp. 2000; Onyango i wsp. 2002; Haigis i Guarente 2006; Ahn i wsp. 2008).

W mięśniu sercowym młodych myszy wykazano, że SIRT3 hamowała sztucznie indukowaną hipertrofię mięśnia sercowego, zmniejszając ilość reaktywnych form tlenu przez pobudzanie aktywacji transkrypcji niektórych antyoksydantów (Sundaresan i wsp 2009) lub blokując działanie czynników promujących hipertrofię (Pillai i wsp. 2010b). Dodatkowo, u 16-miesięcznych myszy kardioprotekcyjną aktywność SIRT3 zaobserwowano w regulacji funkcji mitochondriów (Hafner i wsp. 2010). Dotychczas jednak jej ekspresja na poziomie mRNA i białka w sercu młodych i starych szczurów poddanych głodzeniu i następującemu karmieniu *ad libitum* nie były jeszcze badane.

W przeciwieństwie do ekspresji *Sirt1*, poziom mRNA *Sirt3* nie różnił się w mięśniu sercowym młodych i starych kontrolnych szczurów. Z kolei dwudobowe głodzenie spowodowało wzrost ekspresji *Sirt3* w sercu młodych zwierząt, a przywrócenie karmienia *ad libitum* jej stopniowe obniżanie. U starych szczurów natomiast, głodzenie oraz 4-dniowe karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych statystycznie zmian w ekspresji mRNA *Sirt3*. Otrzymane wyniki sugerują, że w mięśniu sercowym starych szczurów niezmienną ekspresją *Sirt3* mogłaby prowadzić do zaburzonej reakcji metabolicznej na stres dwudniowego głodzenia.

Potwierdzeniem tej hipotezy mogłyby być wyniki otrzymane z analizy współczynników korelacji. W mięśniu sercowym młodych szczurów wzrost ekspresji *Sirt3* w odpowiedzi na dwudniowe głodzenie był pozytywnie skorelowany ze wzrostem ekspresji *Sirt1*, *Sirt7*, transporterów glukozy i kwasów tłuszczowych (*Glut4* i *Cpt-1*) oraz koaktywatora *Pgc-1 $\alpha$* , który odgrywa kluczową rolę w kontroli metabolizmu energetycznego mięśnia sercowego i szkieletowego, uczestnicząc m.in. w regulacji biogenezy mitochondriów, czy regulacji aktywność niektórych enzymów mitochondrialnych (Arany i wsp. 2005; Liang i Ward 2006; Lehman i wsp. 2008; Kong i wsp. 2010). Wykazano, że w mięśniu szkieletowym myszy, SIRT3 pobudza ekspresję *Pgc-1 $\alpha$* , z kolei SIRT1 przez deacetylację powoduje bezpośrednią aktywację koaktywatora PGC-1 $\alpha$ , stąd nie wyklucza się współdziałania SIRT3 z SIRT1 w modyfikowaniu

aktywności PGC-1 $\alpha$  (Gerhart-Hines i wsp. 2007; Kong i wsp. 2010), także w mięśniu sercowym.

Podobnie jak u młodych zwierząt, w mięśniu sercowym starych głodzonych szczurów ekspresja *Sirt3* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Sirt1*, *Sirt7*, *Glut4*, *Cpt-1* oraz *Pgc-1 $\alpha$* . Jednak poza wzrostem ekspresji *Sirt7*, nie zanotowano zmian poziomu mRNA pozostałych badanych genów w reakcji na 48-godzinne głodzenie w porównaniu do kontroli. Uzyskane wyniki wydają się być zgodne z danymi innych autorów wskazującymi na kluczową rolę SIRT3 w regulacji metabolizmu energetycznego mięśnia sercowego szczurów. Zwłaszcza, że jak wykazano w sercu myszy *Sirt3*<sup>-/-</sup>, pod wpływem 48-godzinnego głodzenia dochodzi do około 30% zmniejszenia utleniania wolnych kwasów tłuszczowych w porównaniu z typem dzikim (Hirschey i wsp. 2010).

W przeprowadzonych badaniach uwidoczniły się także pewne zależności między ekspresją genów *Sirt1* i *Sirt3*. Wskutek głodzenia poziom mRNA *Sirt1* nie zmienił się, natomiast ekspresja *Sirt3* wzrosła w sercach młodych szczurów, co wydaje się być wystarczającym impulsem do pobudzenia ekspresji transporterów *Glut4* i *Cpt-1*. Z kolei dwudobowe głodzenie wyraziło się w sercach starych szczurów wyraźną tendencją do obniżenia ekspresji *Sirt1* oraz brakiem zmian w poziomie mRNA *Sirt3*, co mogło być przyczyną braku zmian ekspresji *Glut4* i *Cpt-1*. Uzyskane wyniki wskazują na: 1) występowanie potencjalnie wspólnych ścieżek działania lub współdziałania SIRT1 i SIRT3 (Law i wsp. 2009) oraz 2) mogą potwierdzać kluczową rolę SIRT3 w regulacji metabolizmu energetycznego mięśnia sercowego szczura.

Dotychczas ekspresja *Sirt3* w mięśniu szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów poddanych głodzeniu i następującemu karmieniu *ad libitum* nie była jeszcze badana. W MSM ekspresja *Sirt3* była niższa u starych kontrolnych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt. Wyniki te nie znalazły potwierdzenia w doświadczeniach na myszach (Jing i wsp. 2011), jednak u ludzi starszych (75-81 lat) podzielonych na mniej i bardziej aktywnych fizycznie zauważono, że w mięśniu obszernym bocznym uda (*m. vastus lateralis*) poziom mRNA i białka sirtuiny 3 był niższy w porównaniu z młodą grupą kontrolną (Lanza i wsp. 2008; Joseph i wsp. 2012). Pomimo rozbieżności, uzyskane wyniki zdają się potwierdzać, że starzenie może negatywnie wpływać na ekspresję *Sirt3* w mięśniach szkieletowych, przy czym efekt ten może być gatunkowo specyficzny.

Innym czynnikiem mającym wpływ na ekspresję sirtuiny 3 może być także otyłość, manipulacje pokarmowe oraz aktywność fizyczna. Zaobserwowano, że u młodych myszy otyłych oraz z cukrzycą wywołaną streptozotocyną ekspresja *Sirt3* w mięśniach była o około 50% niższa niż u zdrowych zwierząt (Jing i wsp. 2011). Dodatkowo, karmienie myszy przez 8 tygodni dietą wysokotłuszczową, obniżyło ekspresję *Sirt3* w mięśniach szkieletowych, natomiast trening wytrzymałościowy stymulował wzrost ekspresji *Sirt3* w mięśniach szkieletowych ludzi i myszy (Lanza i wsp. 2008; Palacios i wsp. 2009).

Wpływ głodzenia na ekspresję *Sirt3* w mięśniu szkieletowym mieszanym był całkowicie różny niż w mięśniu serca. Zaobserwowano wyraźny zmniejszenie się poziomu mRNA *Sirt3* w MSM młodych szczurów i tendencję do obniżenia w mięśniu starych zwierząt. W literaturze dane dotyczące wpływu głodzenia na ekspresję sirtuiny 3 w mięśniu szkieletowym myszy są niejednoznaczne. Palacios i wsp. (2009) wykazali, że 24-godzinne głodzenie powodowało wzrost ekspresji *Sirt3* w mięśniu trójgłowym ramienia (*m. triceps*) myszy. Z kolei Jing i wsp. (2011) zanotowali, że dłuższe, bo dwudobowe głodzenie, spowodowało obniżenie ekspresji *Sirt3* w mięśniu czworogłowym uda (*m. quadriceps*) młodych myszy, podobnie jak w badaniach własnych. Wydaje się, że wspomniane rozbieżności mogą wynikać z długości trwania głodzenia lub typu analizowanego mięśnia. Można więc przypuszczać, że obniżona ekspresja genu *Sirt3* jest jednym z mechanizmów adaptacyjnych w mięśniach do warunków głodzenia. W mięśniu szkieletowym myszy *Sirt3*<sup>-/-</sup>, wykazano bowiem, że pod wpływem 48-godzinnego głodzenia dochodzi do około 50% zmniejszenia w utlenianiu wolnych kwasów tłuszczowych w porównaniu z myszami typu dzikiego (Hirschey i wsp. 2010). Dodatkowo, w mięśniach szkieletowych myszy SIRT3 pobudza ekspresję *Pgc-1α*, który pełni kluczową rolę w regulacji metabolizmu energetycznego w mięśniach (Gerhart-Hines i wsp. 2007; Kong i wsp. 2010). W pracy natomiast, w MSM szczurów z obu grup wiekowych zaobserwowano pozytywną korelację między ekspresją genu koaktywatora *Pgc-1α* a ekspresją receptora *Ppar-β/δ*. Przypuszcza się, że aktywacja PPAR-β/δ może zachodzić w wyniku współdziałania z PGC-1α (Wang i wsp. 2010), co prowadzi do pobudzenia transkrypcji kluczowych genów szlaku beta-oksydacji kwasów tłuszczowych (Cheng i wsp. 2004; Wang i wsp. 2010). W mięśniach szkieletowych wykazano także, że PPAR-β/δ uczestniczy w regulacji metabolizmu lipidów (Muio i wsp. 2002) oraz przeciwdziała rozwojowi otyłości i hiperlipidemii u myszy (Wang i wsp. 2010). Należy jednak



zaznaczyć, że w badaniach własnych nie zaobserwowano korelacji między ekspresją *Sirt3* i *Pgc-1α* w MSM szczurów.

Uzyskane wyniki wskazują, że pomimo różnic w ekspresji genu *Sirt3* w mięśniu szkieletowym między szczurami kontrolnymi obydwu grup wiekowych, dochodzi do podobnej zmiany w poziomie mRNA *Sirt3* w odpowiedzi na głodzenie u młodych i starych zwierząt. Wydaje się więc, że ekspresja *Sirt3* w mięśniu szkieletowym zmienia się pod wpływem głodzenia niezależnie od wieku i prawdopodobnie pełni istotną funkcję w ich adaptacji do stresu braku pokarmu. W sposób pośredni potwierdza to także, niezależny od wieku zwierząt wzrost ekspresji *Sirt3* po przywróceniu karmienia *ad libitum*.

### 6.2.3 Ekspresja sirtuiny 7

Wyniki otrzymane z pomiaru ekspresji sirtuiny 7 w mięśniach wskazują na pewne rozbieżności między ekspresją sirtuiny na poziomie mRNA i białka. Zaobserwowano, że poziom białka referencyjnego (GAPDH) nie był jednakowy we wszystkich analizowanych próbach, co mogło mieć wpływ na ostateczne wyniki względnej zawartości białka SIRT7. Jednak na etapie prowadzenia doświadczeń nie znaleziono informacji, aby poziom GAPDH ulegał zmianie u szczurów rasy Wistar- Han pod wpływem starzenia czy manipulacji pokarmowych, stąd jego zastosowanie w pracy. Mimo wszystko, w celu osiągnięcia większej przejrzystości analizowanych rezultatów, w obu modelach doświadczalnych dyskutowane wyniki pomiaru ekspresji będą się odnosiły jedynie do zmian poziomu mRNA *Sirt7* w mięśniach młodych i starych szczurów.

Spośród sirtuin zdecydowanie najmniej wiadomo o sirtuinie 7, jednak na jej istotną rolę w procesach starzenia wskazuje fakt, że myszy *Sirt7<sup>-/-</sup>* żyją prawie dwukrotnie krócej od myszy szczepu dzikiego oraz cechuje je przerost i włóknienie mięśnia sercowego, jak i rozwój kardiomiopatii zapalnej (Vakhrusheva i wsp. 2008a). Jak dotąd, nie poznano roli sirtuiny 7 w mięśniu sercowym i szkieletowym ssaków, ani nie badano wpływu manipulacji pokarmowych (głodzenia-karmienia) na ekspresję sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka w mięśniach ludzi czy zwierząt.

Na istotną rolę sirtuiny 7 w procesach starzenia po raz pierwszy wskazali Vakhrusheva i wsp. (2008a), prowadząc badania na myszach. Wspomniani badacze zauważyli, że w sercach 23-miesięcznych myszy ekspresja *Sirt7* była o 40% niższa niż u 3-

miesięcznych zwierząt. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy zdają się potwierdzać tę zależność. Młode kontrolne szczury miały istotnie wyższą ekspresję sirtuiny 7 na poziomie mRNA w mięśniu sercowym i szkieletowym w porównaniu do dwuletnich zwierząt. Te wyniki, po raz pierwszy uzyskane dla szczura, wskazują na to, że poziom ekspresji sirtuiny 7 w sercu i mięśniu szkieletowym obniża się podczas starzenia. Jedną z konsekwencji tego zjawiska mogłyby być zaburzenia w morfologii tkanki mięśnia sercowego. Podobnie do wspomnianych obserwacji dotyczących morfologii mięśnia sercowego myszy *Sirt7<sup>-/-</sup>* w badaniach Vakhrusheva i wsp. (2008a), wyniki własne wyraźnie wskazują na zwiększony udział tkanki łącznej w strukturze serca starych szczurów i większą średnicę włókien mięśniowych w porównaniu do młodych zwierząt. Nasze obserwacje potwierdzają doniesienia licznych innych autorów opisujące wpływ starzenia na strukturę serca ssaków (Anversa i wsp. 1990; Annoni i wsp. 1998; Hagen i wsp. 2002; Wanagat i wsp. 2002). Intrygująca wydaje się hipoteza, że jedną z przyczyn tych zmian strukturalnych, a w części zapewne i czynnościowych obserwowanych w starzejącym się sercu mogłoby być obniżenie ekspresji *Sirt7*.

Oryginalny charakter mają też uzyskane dane dotyczące zmian ekspresji genu *Sirt7* podczas głodzenia i następującego karmienia *ad libitum*. W mięśniu sercowym głodzenie spowodowało trzykrotny wzrost ekspresji mRNA *Sirt7* u starych szczurów i brak zmiany u młodych zwierząt, zaś przywrócenie karmienia *ad libitum* powodowało jego stopniowe obniżenie do poziomu kontrolnego u starych szczurów i wyraźne obniżenie poniżej niego u młodych zwierząt po 4 i 6 dniach karmienia dietą pełną. Dodatkowo, w mięśniu sercowym zwierząt głodzonych z obu grup wiekowych ekspresja genu *Sirt7* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Sirt3*, *Cpt-1*, *Glut4* i *Pgc-1a*. Wyniki te mogą sugerować, że w sercu dochodzi do współdziałania *Sirt7* i *Sirt3* w modulacji regulatorów metabolizmu energetycznego, które pełnią istotną funkcję w zmianach adaptacyjnych mięśni na warunki głodzenia.

W mięśniu szkieletowym mieszanym kontrolnych szczurów ekspresja *Sirt7*, podobnie jak w mięśniu serca, była wyraźnie niższa u starych w porównaniu do młodych zwierząt. Inny charakter miały natomiast zmiany poziomu mRNA *Sirt7* pod wpływem głodzenia, ponieważ w obydwu grupach wiekowych doszło do istotnego obniżenia ekspresji *Sirt7* w mięśniu szkieletowym i jej stopniowego powrotu do wartości kontrolnych w trakcie sześciu dni karmienia *ad libitum*. Ponadto, zaobserwowano, że ekspresja genu *Sirt7* w MSM młodych i starych zwierząt była pozytywnie skorelowana z

ekspresją *Sirt1*, co mogłoby wskazywać na interakcje obydwu sirtuin w regulacji metabolizmu w mięśniu szkieletowym. Przypuszczenie to wymaga oczywiście weryfikacji eksperymentalnej.

Reasumując można stwierdzić, że proces starzenia w zróżnicowany sposób wpływa na ekspresję *Sirt7* w mięśniu sercowym i w mięśniu szkieletowym pod wpływem głodzenia i następującego po nim karmienia. Otrzymane wyniki mogą także sugerować odmienną funkcję SIRT7 w tkance mięśnia sercowego i szkieletowego w mechanizmach adaptacyjnych do stanu głodzenia, przy czym efektywność tych procesów może się obniżać w trakcie starzenia. Poszukiwanie roli SIRT7 w mięśniach, także w kontekście starzenia i ewentualnego współdziałania z *Sirt1* i *Sirt3*, wydaje się w pełni uzasadnione.

Uzyskane wyniki nasuwają także przypuszczenie, że w trakcie głodzenia dochodzi do współdziałania *Sirt1*, *Sirt3* i *Sirt7* w regulacji metabolizmu mięśnia sercowego młodych i starych zwierząt, jednak określenie charakteru tych oddziaływań wymaga dalszych badań.

### **6.3. Wpływ krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia *ad libitum* na metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych i serca młodych i starych szczurów**

W celu ujawnienia możliwych zaburzeń metabolizmu energetycznego w starzejących się mięśniach szkieletowych (trzech typach: mieszanym, czerwonym i białym) oraz mięśniu serca, 4-miesięczne oraz 24-miesięczne szczury poddano stymulacji pokarmowej: 30-dniowej diecie restrykcyjnej (KDR) oraz ponownemu karmieniu dietą pełną. W ciągu miesiąca szczury z obu grup wiekowych otrzymywały pożywienie w ilości o 40% niższej niż szczury kontrolne. Po tym okresie zwierzętom przywrócono karmienie *ad libitum*, co miało odzwierciedlać powrót do normalnego żywienia u ludzi po zakończeniu diety.

Przed wszystkim zaobserwowano, że KDR spowodowała zmniejszenie masy ciała młodych i starych szczurów, choć był on większy u dwuletnich zwierząt. Dodatkowo, wprowadzenie diety pełnej przywróciło masę początkową młodych zwierząt już po dwóch dniach karmienia *ad libitum* i przekroczyło ją o niecałe 9% w szóstym dniu. Z kolei stare szczury nie odzyskały ciężaru początkowego nawet po sześciu dniach karmienia dietą pełną. Wynik ten może świadczyć o tym, że miesięczne obniżenie kaloryczności

pożywienia może być skuteczną metodą redukcji masy ciała starych zwierząt, głównie przez redukcję tkanki tłuszczowej (Wrońska i wsp. 2014), bez wahania masy ciała często obserwowanego po zaprzestaniu diety (tzw. efektu jo-jo), który wystąpił u młodych szczurów.

Wydaje się także, że pomimo ograniczenia ilości dostarczanego pożywienia młode i stare szczury nie ujawniały objawów niedożywienia. Świadczy o tym fakt, że na każdym etapie doświadczenia u szczurów z obu grup wiekowych obserwowano stały poziom mocznika, albuminy i białka całkowitego w surowicy krwi, co świadczy o wyrównanym bilansie azotowym organizmu. W związku z tym, podczas diety restrykcyjnej składniki odżywcze zawarte w paszy były wystarczające na pokrycie dziennego zapotrzebowania zwierząt.

Podobnie jak w poprzednim modelu badawczym, zaobserwowano że u starych kontrolnych szczurów stężenie TG i WKT było większe w porównaniu do młodych zwierząt, co znalazło potwierdzenie także u innych autorów (Kmieć i wsp. 2005; Kim i wsp. 2009). Wynik ten może sugerować zmniejszony wychwyty kwasów tłuszczowych i obniżoną aktywność lipogenną tkanki tłuszczowej starych szczurów (Swierczyński 2006; Zhu i wsp. 2007). Wysokie stężenie TG, obserwowane m.in. u ludzi starszych oraz otyłych wiąże się z wysokim ryzykiem rozwoju miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych, dlatego ważnym jest by poziom triacylogliceroli w surowicy krwi utrzymywać w granicach normy. Dzięki 30-dniowej diecie restrykcyjnej stężenie TG istotnie obniżyło się, a WKT wzrosło u starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt. Dodatkowo, po przywróceniu karmienia *ad libitum* u starych szczurów stężenie TG wróciło do poziomu podstawowego dopiero w 6 dniu diety pełnej, podobnie jak u młodych zwierząt. Wynik ten sugeruje, że rozpoczęta nawet w późnym wieku dieta restrykcyjna usprawnia mobilizację tkanki tłuszczowej na obniżoną podaż pokarmu oraz poprawia stężenie lipidów w surowicy krwi starych szczurów (Zhu i wsp. 2004; Linford i wsp. 2007; Zhu i wsp. 2007; Kim i wsp. 2009; Valle i wsp. 2010).

Zaobserwowano także podobieństwo z poprzednim modelem doświadczalnym, dotyczące wyższego średniego stężenia cholesterolu - HDL w surowicy krwi starych kontrolnych szczurów niż u młodych zwierząt. Podczas KDR oraz karmienia dietą pełną, poziom Ch-HDL był porównywalny u młodych i starych szczurów oraz nie uległ znaczącym zmianom. Według badań przeprowadzonych na ludziach, wysokie stężenie Ch-HDL jest obecnie ważnym parametrem świadczącym o mniejszym ryzyku zachorowania na choroby niedokrwienne serca (Després i wsp. 2000).

W przypadku stężenia cholesterolu zaobserwowano, że jego wyższy poziom u starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt utrzymywał się na każdym etapie doświadczenia i nie uległ zmianom pod wpływem KDR czy karmienia *ad libitum* u szczurów z obu grup wiekowych. Wynik ten może świadczyć o obniżonej syntezie kwasów żółciowych, będących końcowymi produktami degradacji cholesterolu (Einarsson i wsp. 1985; Ståhlberg i wsp. 1991; Parini i wsp. 1999) lub potwierdzeniem, że u badanych szczurów 30-dniowa DR była nie wystarczająca do obniżenia poziomu cholesterolu we krwi. Wynik ten jest sprzeczny z rezultatami otrzymanymi przez innych autorów, którzy zauważyli, że nie tylko długotrwała (Choi i wsp. 1988; Lane i wsp. 1999), ale również krótkotrwała dieta restrykcyjna może obniżać poziom cholesterolu w surowicy krwi 24-miesięcznych szczurów (Kim i wsp. 2009).

W podsumowaniu można stwierdzić, że krótkotrwała dieta restrykcyjna, rozpoczęta nawet w późnym wieku może być skuteczną metodą redukcji masy ciała starych zwierząt, bez wahania masy ciała często obserwowanego po zaprzestaniu diety (tzw. efektu jo-jo). Dodatkowo, 30-dniowa DR usprawniła mobilizację tkanki tłuszczowej na obniżoną podaż pokarmu oraz obniżyła stężenie lipidów (z wyjątkiem cholesterolu) w surowicy krwi starych szczurów.

### **6.3.1 Pośrednia ocena insulinowrażliwości serca i mięśni szkieletowych szczurów poddanych KDR i przywróceniu karmienia *ad libitum***

Średnie stężenie glukozy i insuliny było porównywalne w surowicy krwi szczurów z obu grup wiekowych. Pod wpływem KDR stężenie obu parametrów obniżyło się u młodych i starych szczurów w porównaniu do grup kontrolnych. Następnie, u młodych szczurów karmienie *ad libitum* przywróciło stężenie glukozy i insuliny do poziomu podstawowego w ciągu zaledwie 2 dni refeedingu. Z kolei u starych szczurów, wprowadzenie diety pełnej nie przywróciło stężenia kontrolnego cukru i hormonu w surowicy krwi szczurów do końca karmienia dietą pełną. Wynik ten może świadczyć o tym, że metabolizm glukozy starych szczurów uległ poprawie po zakończeniu diety restrykcyjnej.

Wpływ starzenia na ekspresję genu *Glut4* jest niejednoznaczny. W grupach kontrolnych ekspresja transportera glukozy była istotnie wyższa jedynie w mięśniu szkieletowym mieszanym młodych szczurów w porównaniu do starych zwierząt, co

obserwowano także u innych ras gryzoni na poziomie białka (Lin i wsp. 1991; Larkin i wsp. 2001) oraz w mięśniu obszernym bocznym uda ludzi starszych (Houmard i wsp. 1995). W połączeniu z wysokim stężeniem WKT w surowicy starych szczurów, które uważa się za jedną z głównych przyczyn zaburzonego wychwytu i fosforylacji glukozy w mięśniach (Boden 1997, 2003) - wynik ten, mógłby sugerować obniżoną insulinowrażliwość i wychwyt glukozy w mięśniu szkieletowym mieszanym starych szczurów (Larkin i wsp. 2001).

W pracy, oraz innych źródłach (Wang i wsp. 1997), nie zaobserwowano jednak związanych z wiekiem zmian w ekspresji genu *Glut4* w sercach szczurów kontrolnych. Podobnie w mięśniach SOL i EDL, co znalazło także potwierdzenie w pracy Sevilla i wsp. (1997), gdzie porównywano 3 i 12 miesięczne samce szczura rasy Sprague-Dawley oraz w pracy Gulve i wsp. (1993), w której oceniano 1- i 25-miesięczne samice szczura Long-Evans.

Zanotowano jednak różnice między szczurami młodymi a starymi w ekspresji genu *Glut4* w mięśniach, w odpowiedzi na 30-dniową dietę restrykcyjną oraz przywrócenie karmienia *ad libitum*. W mięśniu sercowym młodych zwierząt poziom *Glut4* mRNA wzrasta pod wpływem KDR i obniża się pod wpływem przywrócenia karmienia dietą pełną. Podobne wyniki przedstawiono w pracy Masternak i wsp. (2006) w sercach 3-miesięcznych myszy. Wynik ten może sugerować, że u młodych zwierząt, znajdujących się w sytuacji ograniczonej dostępności pokarmu, w sercu dochodzi do zwiększonego transportu glukozy (Masternak i wsp. 2006), pomimo obniżonego stężenia insuliny w surowicy krwi. Potwierdzeniem tej hipotezy może być ujemna korelacja między ekspresją genu *Glut4* w sercach młodych szczurów, a stężeniem glukozy w ich surowicy krwi.

W sercach starych zwierząt krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz przywrócenie karmienia *ad libitum* nie wywołały istotnych zmian w poziomie mRNA transportera glukozy-4 w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki te znalazły potwierdzenie w pracy Wang i wsp. (1997), gdzie 25- miesięczna restrykcja kaloryczna nie wywołała istotnych zmian w ekspresji *Glut4* na poziomie białka w sercach szczurów Brown-Norway. Dane te mogą wskazywać, że w trakcie restrykcji kalorycznej źródłem energii do pracy serca starych szczurów jest nie glukoza, a kwasy tłuszczowe. Potwierdzeniem tej hipotezy może być wzrost ekspresji genu *Cpt-1* w mięśniu sercowym dwuletnich szczurów pod wpływem KDR.

Całkowicie odmienną sytuację niż w mięśniu sercowym w odniesieniu do ekspresji *Glut4* zaobserwowano w mięśniu szkieletowym mieszanym. Poziom mRNA transportera

*Glut4* był dwukrotnie niższy u starych kontrolnych szczurów, zaś krótkotrwała dieta restrykcyjna istotnie obniżyła ekspresję *Glut4* u starych i nie zmieniła jej u młodych zwierząt. Inny trend zmian wystąpił po przywróceniu karmienia dietą pełną, który spowodował obniżenie poziomu mRNA *Glut4* u młodych i wzrost starych szczurów. Na poziomie białka wyższy poziom GLUT4 w MSM młodych w porównaniu do starych zwierząt zaobserwowano także u innych ras szczura (Lin i wsp. 1991; Larkin i wsp. 2001) oraz w mięśni obszernym bocznym uda ludzi starszych (Houmard i wsp. 1995).

Wyniki własnych badań wskazują na to, że wpływ starzenia, KDR i refeeding'u na ekspresję genu *Glut4* może także zależeć także od zawartości w mięśni włókien czerwonych i białych. U młodych szczurów KDR w mięśni szkieletowym czerwonym (SOL) zmniejszyła, w mięśni białym (EDL) zwiększyła, a w mięśni mieszanym (MSM) nie wpłynęła na poziom mRNA *Glut4*. Z kolei wznowienie karmienia *ad libitum*, przywróciło poziom mRNA transportera glukozy w mięśniach SOL i EDL po 4 dniach oraz stopniowo go obniżało w mięśni szkieletowym mieszanym, pomimo wzrostu stężeń glukozy i insuliny w surowicy krwi młodych szczurów. Wyniki własne potwierdzają więc dane innych autorów wskazujące na to, że ekspresja genu *Glut4* pod wpływem diety restrykcyjnej jest mięśniowo-specyficzna i zależna od kompozycji włókien w nich zawartych (Wang i wsp. 1997; Dean i wsp. 1998; Gaster i wsp. 2000). Dodatkowo, może sugerować że poza insuliną, w mięśniach szkieletowych poziom mRNA transportera glukozy-4 jest regulowany przez inne czynniki (Camps i wsp. 1992).

W przeciwieństwie do młodych zwierząt, w mięśni SOL i EDL starych szczurów, KDR oraz przywrócenie karmienia *ad libitum* nie wywołały istotnych zmian w poziomie mRNA transportera glukozy-4 w porównaniu do grupy kontrolnej. Wynik ten mógłby wskazywać na zmniejszoną wrażliwość tkanek na działanie insuliny oraz obniżony wychwyty glukozy w mięśniach starych szczurów. Obecnie za jedną z głównych przyczyn tego zjawiska uważa się wewnątrzmięśniową akumulację lipidów i produktów ich metabolizmu (Kelley i wsp. 1999; Kim i wsp. 2009; Abdul-Ghani i DeFronzo 2010). W momencie, gdy dochodzi do zaburzenia równowagi między nadmiernym dokomórkowym transportem długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, a zdolnością mitochondriów do ich utleniania, dochodzi do akumulacji lipidów wewnątrz miocytów (Bonen i wsp. 2004; Łukaszuk i Chabowski 2006). W konsekwencji lipidy występujące w nadmiarze ulegają estryfikacji do tri- oraz diacylogliceroli i ceramidów, które mogą zmniejszać wrażliwość włókien mięśniowych na działanie insuliny poprzez zmiany w wewnątrzkomórkowych

szlakach transdukcji sygnału (Petersen i wsp. 2003; Łukaszuk i Chabowski 2006; Samuel i wsp. 2010). To z kolei może obniżać aktywność, wewnątrzkomórkowe przemieszczanie się lub ilość GLUT-4 i hamować wychwyt glukozy (Dresner i wsp. 1999; Zhang i wsp. 2010). Zaobserwowano jednak, że pod wpływem redukcji masy ciała, zmniejsza się również zawartość wewnątrzmięśniowych lipidów i poprawia się insulinowrażliwość tkanki mięśniowej (Goodpaster i wsp. 1999 i 2000; Kelley i wsp. 1999; Simoneau i wsp. 1999). W pracy wpływem KDR ekspresja genu *Glut4* obniżyła się mięśniu szkieletowym mieszanym dwuletnich zwierząt, podobnie jak stężenie insuliny i glukozy w ich surowicach krwi. Z kolei, w trakcie przywrócenia karmienia *ad libitum* zanotowano wzrost poziomu mRNA transportera glukozy i obniżone stężenie glukozy, które pozostało poniżej poziomu kontrolnego do końca trwania diety pełnej. W kontekście tych obserwacji można przypuszczać, że krótkotrwała dieta restrykcyjna zwiększa insulinowrażliwość mięśni szkieletowych starych szczurów. Trudno jest jednak ocenić, czy wrażliwość na insulinę, która obniża się wraz z przyrostem masy ciała i poprawia po jego redukcji, czy starzenie jsko takie (*per se*) jest jedną z głównych przyczyn insulinooporności mięśni (Coon i wsp. 1992; Boden i wsp. 1997; Basu i wsp. 2003; Escrivá i wsp. 2007).

### **6.3.2 Leptynooporność i metabolizm kwasów tłuszczowych w mięśniach szczurów poddanych KDR i następującemu karmieniu *ad libitum***

Leptyna prowadzi do obniżenia łaknienia, zmniejszenia spożycia pokarmu, a także do zwiększenia ilości wydatkowanej energii i obniżenia masy tkanki tłuszczowej (Gogga i wsp. 2011; Keung i wsp. 2011). U ssaków, synteza hormonu zachodzi w dojrzałych adipocytach białej tkanki tłuszczowej (WAT), dlatego jej wydzielanie zależy od masy WAT (Zhang i wsp. 2002). W związku z tym, że w trakcie starzenia gryzoni dochodzi do wzrostu masy ciała, głównie przez zwiększoną akumulację tkanki tłuszczowej, wzrasta także stężenie leptyny w surowicy krwi starych zwierząt (Li i wsp. 1997; Fernandez-Galaz i wsp. 2002). W pracy zaobserwowano podobną zależność. Dwuletnie szczury, które miały istotnie wyższą masę ciała niż młode, charakteryzowały się także wyższym stężeniem leptyny w surowicy krwi praktycznie na każdym etapie doświadczenia. Pod wpływem 30-dniowej diety restrykcyjnej, doszło do redukcji masy ciała o 6% i 11% u młodych i starych szczurów, co było powiązane z 73% i 42% obniżeniem stężenia leptyny w ich surowicach krwi. Podobne zależności obserwowano w innych pracach (Fernandez-



Galaz i wsp. 2002; De Solís i wsp. 2012). Pomimo obniżenia stężenia hormonu w surowicach krwi szczurów po KDR, przywrócenie karmienie *ad libitum* spowodowało wzrost stężenia leptyny u szczurów z obu grup wiekowych, jednak był on większy u starych niż u młodych zwierząt. To prawdopodobnie miało związek z nadal większą masą i otłuszczeniem dwuletnich szczurów. Dodatkowo, chociaż karmienie *ad libitum* przywróciło masę ciała młodych szczurów już po 2 dniach, stężenie leptyny w ich surowicach krwi nie osiągnęło wartości kontrolnej przez 6 dni refeedingu. Obserwacja ta jest zgodna z opublikowanymi danymi, które wskazują, że zmiany stężenia leptyny są bardziej wrażliwe na zmniejszenia niż wzrost spożycia pokarmu (Chin-Chance i wsp. 2000).

Wiele badań zdaje się potwierdzać, że wraz z wiekiem dochodzi do większej akumulacji tkanki tłuszczowej, hiperleptynemie (Fernandez-Galaz i wsp. 2002; Gabriely i wsp. 2002; De Solís i wsp. 2012) oraz zwiększonego gromadzenia lipidów w komórkach serca i mięśni szkieletowych starych szczurów (Tucker i Turcotte 2003; Pagano i wsp. 2008) i ludzi (Goodpaster i wsp. 1999, 2000). Ostatni czynnik uważa się za jedną z głównych przyczyn insulinooporności i cukrzycy typu 2, które zwykle występują nierozłącznie z otyłością (Kelley i Goodpaster 2001). Jednym z potencjalnych mechanizmów zwiększonego magazynowania lipidów w obrębie mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych są zmiany w metabolizmie kwasów tłuszczowych (Paradies i wsp. 1995; Kim i wsp. 2009). W związku z tym, poszukuje się odpowiednich metod terapii przeciwdziałającym otyłości i powiązanim z nią objawom syndromu metabolicznego, które działałyby stymulująco na mięśniową oksydację kwasów tłuszczowych i/lub ograniczałyby wewnątrzmięśniową akumulację lipidów (Watt i Hoy 2012).

W mięśniach szkieletowych leptyna zwiększa utlenianie kwasów tłuszczowych (Atkinson i wsp. 2002; Minokoshi i wsp. 2002), przez co obniża w nich akumulację lipidów i tym samym pomaga utrzymać wrażliwość tkanki na działanie insuliny (Wang i wsp. 2008). Aktywność CPT-I w mięśniach może być modyfikowana przez obniżoną podaż pokarmu (Pilegaard i wsp. 2003; Kim i wsp. 2009), zawartość tłuszczu w diecie (Power i Newsholme 1997; Cameron-Smith i wsp. 2003), lub ulegać zmianom u otyłych (Franch i wsp. 2002) i starych szczurów (Odiet i wsp. 1995; Kim i wsp. 2009). W niniejszej pracy dokonano analizy poziomu ekspresji genu *Cpt-I* w sercu i trzech typach mięśni szkieletowych młodych i starych szczurów, w warunkach 30-dniowej diety restrykcyjnej i przywrócenia diety pełnej przez 2 dni, co dotychczas tylko częściowo zostało zbadane.

W pracy nie zaobserwowano różnic w aktywności CPT-I w mięśniach szkieletowych (MSM, SOL, EDL) starych kontrolnych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt. Jedynie w sercu, aktywność enzymu była o 54% wyższa u starych kontrolnych szczurów niż u młodych zwierząt, choć wynik ten był na granicy istotności statystycznej ( $p= 0,06$ ). Ekspresja genu *Cpt-I* w sercu szczurów kontrolnych była porównywalna u zwierząt z obu grup wiekowych, z kolei w mięśniu szkieletowym mieszanym była ponad 2-krotnie wyższa u młodych kontrolnych szczurów niż u starych zwierząt. Oba wyniki szczegółowo opisano powyżej omawiając model głodzenia – karmienia.

Ekspresja mRNA *Cpt-I* w mięśniu czerwonym (oksydacyjnym) młodych szczurów zwiększyła się i nie uległa zmianie w ich mięśniu EDL (glikolitycznym) podczas krótkotrwałej diety restrykcyjnej oraz dwóch dni karmienia *ad libitum*. Biorąc pod uwagę, że w tych samych warunkach i mięśniach ekspresja genu *Glut4* była dokładnie odwrotna, wydają się że badane mięśnie wykorzystywały dostępne substraty energetyczne zgodnie z ich preferencjami metabolicznymi.

W MSM młodych szczurów, 30-dniowa dieta restrykcyjna nie wywołała istotnych zmian w poziomie ekspresji enzymu, co stwierdzono także w pracy Kim i wsp. (2009). Dopiero po wprowadzeniu diety pełnej przez dwa dni poziom mRNA *Cpt-I* obniżył się, podobnie jak aktywność enzymu, która stopniowo zmniejszała się już pod wpływem KDR. Gdyby potraktować MSM jako głównego przedstawiciela metabolizmu energetycznego mięśni, wynik ten mógłby sugerować hipotezę zaproponowaną przez Cettour-Rose i wsp. (2005), która zakłada, że u młodych szczurów, po redukcji masy ciała, w trakcie przywrócenia diety pełnej dochodzi przede wszystkim do promowania lipogenezy w tkance tłuszczowej. Potwierdzeniem tej hipotezy mógłby być fakt, że młode szczury już w drugim dniu karmienia *ad libitum* wróciły do ciężaru ciała sprzed diety, głównie przez zwiększoną masę i aktywność lipogenną tkanki tłuszczowej (Wronska i wsp. 2014).

W przeciwieństwie do młodych szczurów i wyników otrzymanych przez Kim i wsp. (2009), w mięśniu szkieletowym mieszanym, ale także w mięśniach czerwonym (SOL) i białym (EDL) starych zwierząt, KDR oraz przywrócenie karmienia *ad libitum* nie wywołały istotnych zmian w aktywności i poziomie mRNA *Cpt-I*. Ponadto, zaobserwowano, że ekspresja genu *Cpt-I* w MSM starych zwierząt poddanych KDR była skorelowana z stężeniem leptyny w ich surowicy krwi ( $r= 0.53$ ,  $p= 0,0003$ ). Otrzymane wyniki, czyli brak reakcji w ekspresji genu *Cpt-I* i aktywności enzymu w mięśniach starych szczurów pomimo podwyższonego stężenia WKT i obecności leptyny w surowicy

krwi w czasie KDR, istotnie wyższa masa ciała w stosunku do młodych zwierząt mogą wskazywać na leptynooporność w mięśni mieszanych dwuletnich szczurów i możliwe wewnątrzmięśniowe nagromadzenie lipidów, które zaburzało procesy wychwytu i prawdopodobnie oksydacji kwasów tłuszczowych. W związku z tym, możliwe jest, że sama dieta może być niewystarczająca, by poprawić metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych. Schenk i Horowitz (2006) wykazali bowiem, że dieta niskokaloryczna dopiero w połączeniu z treningiem wytrzymałościowym istotnie podwyższyła oksydację kwasów tłuszczowych i podwyższyła ilość CPT-I w mięśni obszernym bocznym uda otyłych kobiet (Corpeleijn i wsp. 2000; van Aggel-Leijssen i wsp. 2001; Solomon i wsp. 2008). Tym bardziej, trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy uzyskane w pracy wyniki są rezultatem procesów starzenia jako takich (*per se*), czy może innych czynników, jak otyłość starych szczurów, brak ruchliwości, lub wszystkich tych procesów jednocześnie.

Dotychczas, w mięśni sercowym ekspresja genu *Cpt-I* i aktywność enzymu w kontekście starzenia szczura i pod wpływem krótkotrwałej diety restrykcyjnej, nie były jeszcze badane. Jak wspomniano powyżej, w myocardium nie zaobserwowano różnic w poziomach mRNA *Cpt-I* między szczurami kontrolnymi z obu grup wiekowych. W sercach młodych szczurów KDR spowodowało wzrost, a przywrócenia karmienia *ad libitum* zmniejszenie ekspresji genu *Cpt-I* oraz aktywności enzymu. Wynik ten może potwierdzać zależność, że w trakcie niedostatku pokarmu kwasy tłuszczowe są głównym źródłem energii dla pracującego mięśnia sercowego (Neely i Morgan 1974; Suzuki i wsp. 2002; Pagano i wsp. 2008; Zhang i wsp. 2010). U starych szczurów natomiast, 30-dniowa dieta restrykcyjna spowodowała wzrost mRNA *Cpt-I*, bez zmian w poziomie aktywności enzymu. Dodatkowo, wprowadzenie karmienia *ad libitum*, przywróciło poziom kontrolny ekspresji enzymu i jednocześnie spowodowało prawie 2-krotny wzrost aktywności CPT-I w sercach starych szczurów. Uzyskane wyniki sugerują, że ewentualne zakłócenia w wychwycie kwasów tłuszczowych mogą wynikać nie ze zmian w ekspresji genu *Cpt-I*, ale z zaburzonej aktywności enzymu w sercach dwuletnich szczurów w porównaniu do młodych zwierząt. Przypuszczalnymi czynnikami mogącymi zaburzać aktywność enzymu może być m.in. obniżona zawartość karnityny (substratu niezbędnego do utworzenia acylokarnityny, czyli związku karnityny i długołańcuchowych acylo-CoA, które CPT-I może transportować do wnętrza mitochondrium) (Tanaka i wsp. 2004), podwyższone stężenie malonylo-CoA (początkowego metabolitu biosyntezy kwasów tłuszczowych, będącego endogennym inhibitorem CPT-I) (Moreau i wsp. 2004), czy redukcja wydajności katalitycznej CPT-I w sercach starych szczurów (Gómez i wsp. 2012).

W podsumowaniu można stwierdzić, że metabolizm energetyczny w mięśniach szkieletowych różni się między szczurami młodymi a starymi. Trudno jest jednak jednoznacznie określić, czy uzyskane w pracy wyniki są rezultatem procesów starzenia jako takiego (*per se*), czy może innych czynników, jak otyłość starych szczurów, brak ruchliwości lub wszystkich tych procesów jednocześnie. Wydaje się jednak, że u starych szczurów to nadmierna akumulacja tkanki tłuszczowej, hiperleptynemia i prawdopodobnie leptynooporność skutkowały w obniżonym wychwycie kwasów tłuszczowych w ich mięśniach szkieletowych. W sercu natomiast, ewentualne zakłócenia metabolizmu tłuszczów mogą wynikać nie ze zmian w ekspresji genu *Cpt-1*, ale z zaburzonej aktywności enzymu w sercach dwuletnich szczurów.

#### **6.4. Wpływ krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia *ad libitum* na strukturę mięśnia sercowego młodych i starych szczurów**

W niniejszej pracy preparaty histologiczne z koniuszków serca młodych i starych szczurów zostały pobrane od pojedynczych przedstawicieli osobników każdej grupy doświadczalnej. W związku z tym, zmiany struktury mięśnia sercowego starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt zostały omówione wyłącznie na podstawie przedstawionych przykładów, zaś przedstawiane wnioski opierają się na przypuszczeniu, że podobne zmiany mogą zachodzić u pozostałych szczurów z badanej grupy wiekowej czy eksperymentalnej.

Przerost (hipertrofia) serca jest jedną z najczęściej obserwowanych zmian w strukturze mięśnia sercowego u ludzi starszych (Karavidas i wsp. 2010). Dotyczy to szczególnie lewej komory, w której rozrost kardiomiocytów zachodzi m.in. w skutek zawału serca, czy choroby nadciśnieniowej, często diagnozowanej u osób starszych (Karavidas i wsp. 2010). Ze względu na niewielki potencjał regeneracyjny kardiomiocytów, hipertrofia komórek mięśnia sercowego może być także wynikiem zmian adaptacyjnych, zachodzących w skutek zmniejszania się liczby miocytów serca w wyniku apoptozy (Anversa i wsp. 1990; Kwak 2013). Zjawisko to obserwowane w *myocardium* starzejących się ludzi i zwierząt wymusza hipertrofię pozostałych kardiomiocytów oraz stopniowe włóknienie mięśnia sercowego (Anversa i wsp. 1990; Annoni i wsp. 1998; Hagen i wsp. 2002; Wanagat i wsp. 2002), czego konsekwencją jest upośledzenie

kurczliwości serca, arytmie oraz dysfunkcja rozkurczowa lewej komory (Boyle i wsp. 2011; Dai i wsp. 2012).

Na wykonanych mikrofotografiach serca starego szczura kontrolnego, którego skrawki wybarwiono dwiema metodami, średnica włókien mięśniowych oraz ilość tkanki łącznej w *myocardium* są wyraźnie większe w porównaniu do serca młodego szczura kontrolnego. Podobne wyniki otrzymał Annoni i wsp. (1998) z obserwacji 19-miesięcznych samców szczura Sprague-Dawley w porównaniu do 2-miesięcznych zwierząt oraz Anversa i wsp. (1990), analizując serca szczurów Fischer 344 w wieku 4, 12, 20, i 29 miesięcy.

Badania nad wpływem restrykcji kalorycznej na funkcjonowanie mięśnia sercowego były opublikowane jedynie przez kilku autorów i dotychczas dostarczyły niejednoznacznych wyników. U ludzi, Viljanen i wsp. (2009) zaobserwowali, że u 33 otyłych pacjentów poddanych przez 6 tygodni niskokalorycznej diecie doszło do obniżenia masy mięśnia sercowego oraz zaburzeń pracy serca. Z kolei Hammer i wsp. (2008) wykazali, że zastosowanie 16-tygodniowej bardzo niskokalorycznej diety u ludzi otyłych (BMI > 35) z cukrzycą typu 2 poprawiło zdolność rozkurczową serca. Natomiast u 2-miesięcznych szczurów rasy Wistar poddanych 50% diecie restrykcyjnej przez okres 3 miesięcy nie doszło do zmniejszenia przyrostu tkanki włóknistej w strukturze serca w porównaniu do 5-miesięcznych szczurów kontrolnych (Okoshi i wsp. 2001). W badaniach własnych również zaobserwowano, że po 30-dniowej diecie restrykcyjnej średnica włókien mięśniowych oraz ilość tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego młodego szczura wydaje się być większa w porównaniu ze szczurem kontrolnym. Dodatkowo, przywrócenie karmienia *ad libitum*, na przedstawionych przykładach nie wskazuje na pojawienie się jakichkolwiek zmian w odniesieniu do szczura KDR. Własne obserwacje wydają się świadczyć o negatywnym wpływie krótkotrwałej diety restrykcyjnej na strukturę mięśnia sercowego młodych zwierząt, jednak wniosek ten wymaga potwierdzenia na większej ilości zwierząt.

U starych zwierząt wykazano, że długotrwała dieta restrykcyjna, trwająca całe życie szczurów rasy Fisher 344 przeciwdziałała oznakom starzenia serca, jak apoptoza, autofagia czy gromadzenie się lipofuscyny w kardiomiocytach oraz poprawiła jego pracę (Shinmura i wsp. 2011). Wykazano także, że nawet półroczne 40% ograniczenie podaży pokarmu u 24-miesięcznych szczurów Sprague-Dawley zmniejszyło apoptozę kardiomiocytów oraz zapobiegło zmniejszeniu funkcjonalności lewej komory serca

(Niemann i wsp. 2010). W badaniach własnych z kolei, poddanie starych szczurów 30-dniowej diecie restrykcyjnej, a także następującemu po niej 6-dniowemu karmieniu *ad libitum* stanowiło zbyt krótki okres, aby mogły się uwidocznić istotne zmiany w średnicy włókien czy udziale tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego.

## **6.5. Wpływ krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia *ad libitum* na ekspresję sirtuin w sercu i trzech typach mięśni szkieletowych młodych i starych szczurów w kontekście zmian ekspresji genów regulatorów metabolizmu energetycznego**

### **6.5.1 Ekspresja sirtuiny 1**

Genetycznie zmodyfikowane myszy stały się najlepszym modelem badawczym, obrazującym rolę sirtuiny 1 w regulacji metabolizmu energetycznego organizmu podczas długotrwałej diety restrykcyjnej. Myszy *Sirt1<sup>-/-</sup>* (ang. *knock-out*) wykazywały liczne zaburzenia metaboliczne, mniejszą aktywność fizyczną oraz nie obserwowano u nich efektu wydłużenia życia pod wpływem długotrwałej diety restrykcyjnej (Chen i wsp. 2005; Boily i wsp. 2008). Z drugiej strony, u transgenicznych myszy, u których wywołano konstytutywną ekspresję SIRT1, zaobserwowano pewne cechy myszy przebywających na diecie restrykcyjnej, ponieważ zwierzęta te były szczupłe, bardziej aktywne oraz charakteryzowały się zwiększoną tolerancją glukozy (Bordone i wsp. 2007). Z kolei u myszy z umiarkowaną nadekspresją SIRT1, pomimo karmienia dietą wysokotłuszczową, nie zaobserwowano obniżenia insulinowrażliwości mięśni, czy rozwoju cukrzycy (Banks i wsp. 2008). Zbliżone wyniki otrzymali także Lagouge i wsp. (2006), którzy podając myszom szczepu dzikiego (ang. *wild-type*) resweratrol, będący aktywatorem sirtuin, (Kaeberlein i wsp. 2005) zaobserwowali, że zwierzęta te żyły dłużej niż kontrole karmione bez polifenolu, ujawniały zwiększoną pojemność oksydacyjną mięśni oraz nie wykazywały cech rozwoju zespołu metabolicznego, mimo indukowanej dietą otyłości. Podobne dane uzyskano także po zastosowaniu niedawno odkrytego agonisty sirtuiny 1 - SRT1720 (Milne i wsp. 2007), który podawany myszom dzikim wywoływał pewne adaptacje metaboliczne obserwowane przy stosowaniu długotrwałej diety restrykcyjnej, jak wzrost utleniania kwasów tłuszczowych w mięśniach i wątrobie, czy wzrost insulinowrażliwości mięśni (Milne i wsp. 2007; Feige i wsp. 2008). W piśmiennictwie brak jest jak dotąd doniesień opisujących wpływ krótkotrwałej diety restrykcyjnej i przywrócenia karmienia

*ad libitum* na ekspresję genu *Sirt1* w mięśni sercowym i trzech typach mięśnia szkieletowego młodych i starych szczurów.

Otrzymane wyniki wskazują, że ekspresja genu *Sirt1* w mięśni sercowym starych kontrolnych szczurów jest wyższa niż u młodych zwierząt, co mogłoby wskazywać na jej kardioprotekcyjną rolę w sercach dwuletnich zwierząt, jak to szczegółowo opisano w odniesieniu do modelu głódzenie – karmienie. Krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz 4-dniowe karmieni *ad libitum* obniżyły ekspresję *Sirt1* w sercach młodych szczurów. Wyniki te są sprzeczne z danymi przedstawionymi przez Yu i wsp. (2014), którzy wykazali, że trwająca trzy tygodnie 60% restrykcja kaloryczna powodowała istotny wzrost ekspresji sirtuiny 1 na poziomie mRNA i białka u młodych szczurów Sprague-Dawley. Rozbieżności w przedstawionych wynikach mogą być związane z różnicami genetycznych między rasami szczura, czy nawet długością trwania diety (różnica 9 dni może być istotna, ponieważ szczury rasy Sprague-dawley intensywnie rosną przez całe życie, w przeciwieństwie do szczurów rasy Wistar będących przedmiotem własnych badań).

W mięśni sercowym starych zwierząt, w przeciwieństwie do młodych szczurów poziom mRNA *Sirt1* nie zmienił się pod wpływem KDR, ale był on istotnie wyższy niż u młodych zwierząt. Pomimo tego, w oparciu o wyniki badań innych autorów wydaje się, że w mięśni sercowym starych szczurów może dochodzić do obniżenia aktywności SIRT1. Braidy i wsp. (2011) zaobserwowali, że ekspresja białka SIRT1 w sercach 24-miesięcznych samic szczura Wistar wzrasta, ale jej aktywność istotnie maleje w porównaniu do 3-miesięcznych zwierząt, głównie wskutek obniżenia poziomu dostępnego koenzymu NAD<sup>+</sup>. Choć w pracy aktywność sirtuiny 1 nie była badana, wyniki analizy korelacji zdają się potwierdzać przedstawioną hipotezę. Zanotowano bowiem, że ekspresja *Sirt1* w sercu dwuletnich szczurów była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Sirt3*, *Sirt7* oraz *Ppar-β/δ*, zaś ekspresja *Ppar-β/δ* była też skorelowana z ekspresją *Pgc-1α* i *Glut4*. Pod wpływem KDR, oprócz wzrostu ekspresji *Sirt3* i *Sirt7*, poziom mRNA pozostałych wymienionych genów nie uległ zmianie, pomimo podwyższonej ekspresji *Sirt1* w sercach starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt. Wyniki te mogą sugerować, że aktywność SIRT1 maleje w sercach starych szczurów, czego konsekwencją może być brak zmian ekspresji regulatorów metabolizmu energetycznego w warunkach ograniczonej dostępności pokarmu.

Podobnie jak w mięśni sercowym w trzech typach mięśni szkieletowych poziom mRNA *Sirt1* był wyższy u starych kontrolnych szczurów niż u młodych zwierząt, choć w

mięśniu SOL wynik ten nie był znamieny statystycznie. W mięśniu szkieletowym mieszanym podobny wynik otrzymali także Koltai i wsp. (2010), co szczegółowo opisano powyżej omawiając model głodzenia – karmienia.

Uzyskane wyniki wskazują, że zmiany ekspresji genu *Sirt1* w trakcie krótkotrwałej diety restrykcyjnej mogą być zależne od kompozycji włókien danego mięśnia. U młodych szczurów zarówno w mięśniu z przewagą włókien czerwonych (SOL) jak i włókien białych (EDL) krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz następujące po niej karmienie *ad libitum* nie spowodowały zmian w poziomie ekspresji genu *Sirt1*. Zaskakująca jest więc własna obserwacja, że w mięśniu szkieletowym mieszanym (MSM) młodych szczurów KDR silnie podwyższała poziom mRNA *Sirt1*, który po 2 dniach karmienia dietą pełną powrócił do poziomu kontroli i nie zmienił się podczas dalszych dni karmienia. Nieco podobne wyniki otrzymali Chen i wsp. (2008), badając 4-miesięczne myszy poddane trzymiesięcznej diecie restrykcyjnej. Autorzy ci zaobserwowali dodatkowo, że wzrost poziomu białka SIRT1 w mięśniu szkieletowym (autorzy nie podali, który rodzaj mięśnia analizowano) był powiązany z podwyższeniem zawartości dostępnego koenzymu  $NAD^+$  oraz wzrostem stosunku  $NAD^+/NADH$  w wyniku restrykcji kalorycznej (Chen i wsp. 2008).

Z drugiej strony, u starych szczurów KDR spowodowała wzrost (MSM), obniżenie (EDL, różnica na granicy istotności statystycznej) oraz nie zmieniła (SOL) ekspresji *Sirt1* w mięśniach szkieletowych. Podobne zależności między ekspresją sirtuiny 1 na poziomie białka, a kompozycją włókien mięśnia brzuchatego łydki zanotowali także Joseph i wsp. (2013) u 27-miesięcznych samców szczura Fischer 344 × Brown Norway.

W MSM starych szczurów poddanych krótkotrwałej restrykcji kalorycznej wzrostowi ekspresji genu *Sirt1* towarzyszyło obniżenie ekspresji genów transportera glukozy *Glut4* i koaktywatora *Pgc-1 $\alpha$*  i brak zmian poziomu mRNA *Ppar- $\beta/\delta$* . Wyniki te mogą sugerować, że w MSM starych szczurów wzrost ekspresji *Sirt1* jest niewystarczający do wywołania zmian adaptacyjnych wobec obniżonej podaży pokarmu, być może wskutek towarzyszącej starzeniu obniżonej aktywności SIRT1 w starzejących się mięśniach (Koltai i wsp. 2010). Wydaje się, że wzrost aktywności SIRT1 w mięśniach szkieletowych starych szczurów mógłby być osiągnięty przez połączenie diety restrykcyjnej z odpowiednimi ćwiczeniami fizycznymi. Wykazano bowiem, że po wprowadzeniu ćwiczeń fizycznych w mięśniach dwuletnich szczurów Wistar wzrasta aktywność (Suwa i wsp. 2008; Koltai i wsp. 2010) oraz poziom białka SIRT1 (Pauli i wsp. 2010), czemu towarzyszyła poprawa



insulinowrażliwości mięśni oraz wzrost aktywności PGC-1 $\alpha$  i biogenezy mitochondriów (Suwa i wsp. 2008; Pauli i wsp. 2010).

Towarzyszące starzeniu zmiany poziomu mRNA *Sirt1* w trakcie KDR i przywrócenia karmienia wystąpiły szczególnie wyraźnie w mięśniu EDL (o przewodze włókien glikolitycznych) dwuletnich szczurów. Mimo, że ekspresja genu *Sirt1* w mięśniu EDL starych zwierząt obniżyła się pod wpływem KDR i wróciła do poziomu kontrolnego w trakcie karmienia *ad libitum*, w każdej grupie doświadczalnej była one istotnie wyższa niż u młodych zwierząt. Dodatkowo w mięśniu EDL starych szczurów poddanych KDR poziom mRNA *Sirt1* był pozytywnie skorelowany z ekspresją *Pgc-1 $\alpha$*  i *Ppar- $\beta/\delta$* , który dodatkowo był powiązany z ekspresją genów *Glut4* i *Cpt-1*. Uzyskane wyniki sugerują, że sirtuina 1, której ekspresja w warunkach KDR może podlegać kontroli przez badane czynniki transkrypcyjne wydaje się być jednym z elementów regulujących metabolizm energetyczny w mięśniu EDL starych szczurów. Należy jednak zwrócić uwagę, że pod wpływem KDR poziom mRNA *Pgc-1 $\alpha$*  wzrósł, *Ppar- $\beta/\delta$*  obniżył się, a ekspresja *Glut4* i *Cpt-1* nie uległa zmianie w mięśniu białym (EDL) starych szczurów w porównaniu do kontroli.

W podsumowaniu można stwierdzić, że u młodych szczurów w dwóch rodzajach mięśni szkieletowych KDR i przywrócenie karmienia *ad libitum* nie spowodowały zmian w poziomie ekspresji genu *Sirt1* (wyjątek stanowił wzrost ekspresji w MSM pod wpływem KDR). Natomiast pomimo podwyższonej ekspresji genu *Sirt1* w sercu oraz mięśniach szkieletowych starych szczurów, dane innych autorów wskazują na to, że prawdopodobnie w badanych tkankach dochodzi do obniżonej aktywności SIRT1. Wskazują na to braki zmian lub obniżenie poziomu mRNA regulatorów metabolizmu energetycznego, pomimo wzrostu ekspresji *Sirt1* w mięśniach starych szczurów w warunkach krótkotrwałej diety restrykcyjnej. Dodatkowo, uzyskane wyniki sugerują, że zmiany ekspresji genu *Sirt1* w trakcie KDR są zależne od kompozycji włókien danego mięśnia.

### 6.5.2 Ekspresja sirtuiny 3

Sirtuina 3 pełni istotną funkcję w procesach adaptacyjnych mięśni do stresu metabolicznego wywołanego aktywnością fizyczną oraz manipulacjami pokarmowymi, jak karmienie wysokotłuszczową dietą, głodzenie lub długotrwała dieta restrykcyjna (Lanza i

wsp. 2008; Palacios i wsp. 2009; Hirschey i wsp. 2010; Qiu i wsp. 2010; Shimazu i wsp. 2010). Pod wpływem wymienionych czynników dochodzi do zmian potencjału oksydoredukcyjnego komórek, zmiany stosunku  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  w kierunku zwiększenia się puli cząsteczek koenzymu  $\text{NAD}^+$  i aktywacji SIRT3 (Lin i wsp. 2000; Onyango i wsp. 2002; Haigis i Guarente 2006; Ahn i wsp. 2008). Dotychczas jednak jej ekspresja na poziomie mRNA i białka w mięśniu sercowym oraz trzech typach mięśni szkieletowych młodych i starych szczurów poddanych 30-dniowej diecie restrykcyjnej i następującemu karmieniu *ad libitum* nie były jeszcze badane.

W mięśniu sercowym ekspresja *Sirt3* nie tylko była podobna u młodych i starych szczurów kontrolnych, ale także w zbliżony sposób wyraźnie wzrosła pod wpływem KDR i powróciła do poziomu kontrolnego po wprowadzeniu diety pełnej u zwierząt z obu grup wiekowych. Wyniki te pozwalają przypuszczać, że ekspresja *Sirt3* w sercu zmienia się pod wpływem KDR niezależnie od wieku. Ponadto, w przeciwieństwie do głodzenia przez 2 doby, 30-dniowa dieta restrykcyjna wydaje się być wystarczającym stymulatorem ekspresji *Sirt3* w mięśniu sercowym starych szczurów nawet jeśli została ona rozpoczęta w późnym wieku.

W trakcie KDR podwyższony poziom mRNA *Sirt3* był pozytywnie skorelowany ze wzrostem ekspresji *Pgc-1 $\alpha$*  i *Glut4* w sercach 5-miesięcznych zwierząt. Wynik ten może świadczyć o tym, że w czasie KDR produkty białkowe tych trzech genów uczestniczą wspólnie w regulacji m.in. metabolizmu glukozy w sercach młodych szczurów. Zaobserwowano bowiem, że w warunkach podstawowych PGC-1 $\alpha$  może stymulować ekspresję mRNA *Glut4* w mysich mioblastach ( $\text{C}_2\text{C}_{12}$ ), co koreluje ze zwiększonym transportem glukozy do wnętrza komórek (Michael i wsp. 2001). W badaniach własnych, ekspresja *Pgc-1 $\alpha$*  w sercach młodych szczurów była także pozytywnie skorelowana z ekspresją *Glut4*.

W mięśniu sercowym 24-miesięcznych szczurów poddanych KDR poziom mRNA *Sirt3* był pozytywnie skorelowany z ekspresją *Sirt1*, *Ppar- $\beta/\delta$*  i *Glut4*. Ponadto zaobserwowano pozytywną korelację między *Ppar- $\beta/\delta$*  a *Pgc-1 $\alpha$*  i *Glut4*. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że sirtuina 3 (możliwe, że wraz z sirtuiną 1) uczestniczy w sercach starych szczurów w mechanizmach kontroli ekspresji genów w odpowiedzi na obniżoną podaż pokarmu.

Dane otrzymane z analizy trzech typów mięśni szkieletowych wskazują, że ekspresja *Sirt3* jest zależna od kompozycji włókien danego mięśnia oraz podlega zmianom pod wpływem manipulacji dietetycznych, co wykazano także w innych pracach (Palacios i

wsp. 2009; Lin i wsp. 2014). Ponadto, zamiany te są różne w zależności od wieku szczura. Zaobserwowano, że ekspresja genu *Sirt3* w trzech typach mięśni szkieletowych była niższa w MSM, wyższa w SOL, lub utrzymała się na podobnym poziomie w EDL starych szczurów kontrolnych w porównaniu do młodych zwierząt.

Według danych literaturowych ekspresja *Sirt3* w mysich mięśniach szkieletowych ulega dynamicznym zmianom pod wpływem diety restrykcyjnej oraz aktywności fizycznej (Palacios i wsp. 2009). Wykazano bowiem, że 12-tygodniowa (Jing i wsp. 2011), jak i 12-miesięczna (Palacios i wsp. 2009) dieta restrykcyjna stymuluje wzrost ekspresji mRNA *Sirt3* w mięśni szkieletowym mieszanym myszy. W pracy zanotowano jednak przeciwne wyniki, ponieważ 30-dniowa dieta restrykcyjna oraz przywrócenie karmienia *ad libitum* spowodowały obniżenie ekspresji *Sirt3* w MSM i nie zmieniły jej istotnie w mięśniach SOL i EDL młodych szczurów w porównaniu do grupy kontrolnej.

W mięśni czerwonym (SOL) młodych szczurów, w trakcie KDR ekspresja genu *Sirt3* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Sirt1*, *Ppar- $\beta/\delta$* , *Glut4* i *Cpt-I*. Z kolei w mięśni EDL młodych szczurów ekspresja *Sirt3* była powiązana z ekspresją *Pgc-1 $\alpha$*  i *Glut4*. Dane te wskazują, że w trakcie 30-dniowej diety restrykcyjnej w mięśniach szkieletowych młodych szczurów sirtuina 3 (możliwe, że razem z sirtuiną 1) w sposób mięśniowo-specyficzny uczestniczy w mechanizmach regulacji i adaptacji metabolizmu energetycznego na warunki obniżonej podaży pokarmu.

W przypadku starych szczurów, krótkotrwała dieta restrykcyjna oraz przywrócenie diety pełnej (w przypadku mięśni SOL i EDL, a więc z przewagą włókien czerwonych lub białych) wydają się mieć niewielki wpływ na potencjalne zmiany metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych starych szczurów w porównaniu z młodymi zwierzętami. KDR obniżyła ekspresję *Sirt3* w SOL i nie zmieniła jej istotnie w MSM i EDL starych szczurów. W mięśni czerwonym (SOL) poziom mRNA *Sirt3* szczurów z grupy KDR był pozytywnie skorelowany z ekspresją *Ppar- $\beta/\delta$*  oraz *Cpt-I*. Z kolei, w mięśni szkieletowym mieszanym oraz białym (EDL) ekspresja *Sirt3* była pozytywnie skorelowana z ekspresją *Glut4* oraz *Ppar- $\beta/\delta$* , którego poziom mRNA dodatkowo korelował z *Pgc-1 $\alpha$* . Uzyskane wyniki mogą sugerować, że sirtuina 3 uczestniczy w mechanizmach regulacji wychwytu i oksydacji kwasów tłuszczowych w mięśni czerwonym oraz metabolizmu glukozy w mięśniach glikolitycznych starych szczurów w warunkach obniżonej podaży pokarmu współdziałając z wymienionymi czynnikami transkrypcyjnymi (*Pgc-1 $\alpha$*  i *Ppar- $\beta/\delta$* ) oraz efektorami ich działania (*Cpt-I* i *Glut4*).

Poza ewentualnym wpływem starzenia, ekspresja genu *Sirt3* mogłaby być zależna także od innych czynników, jak wewnątrzmięśniowa akumulacja lipidów (choć w pracy nie było to badane), względnie otyłość starych zwierząt, które również mogą negatywnie wpływać na ekspresję *Sirt3* (Jing i wsp. 2011), PGC-1 $\alpha$  (Benton i wsp. 2006) czy *Ppar- $\beta/\delta$*  (Nagatomo i wsp. 2009) w mięśniach szkieletowych szczura.

Warto jednak zwrócić uwagę, że uzyskane wyniki wskazują na dodatkową rolę receptora PPAR- $\beta/\delta$  w mięśniu sercowym i szkieletowym szczurów. Wydaje się bowiem, że PPAR- $\beta/\delta$  może być zaangażowany nie tylko w oksydację kwasów tłuszczowych, na co wskazują dane literaturowe (Muio i wsp. 2002; Wang i wsp. 2003; Cheng i wsp. 2004; Wang i wsp. 2010), ale także w metabolizm glukozy w tkankach mięśniowych. Potwierdzeniem tej hipotezy, może być bardzo wysoka ekspresja *Ppar- $\beta/\delta$*  w mięśniu EDL (o przewodzie włókien glikolitycznych) starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt w warunkach KDR i przywrócenia diety pełnej oraz przedstawione analizy współczynnika korelacji.

Reasumując można stwierdzić, że ekspresja *Sirt3* jest mięśniowo-specyficzna i podatna na krótkotrwałą dietę restrykcyjną niezależnie od wieku szczurów. W przeciwieństwie do głodzenia przez dwie doby, KDR wyraźnie stymuluje ekspresję *Sirt3* w mięśniu sercowym starych szczurów, ale przywrócenie karmienia szybko redukuje poziom mRNA *Sirt3* do wartości kontrolnych.

Analiza korelacji ekspresji *Sirt1* oraz *Sirt3* sugeruje możliwość współdziałania SIRT3 z SIRT1 w mięśniu sercowym i mięśniach szkieletowych szczura, jednak hipoteza ta wymaga doświadczalnej weryfikacji.

### 6.5.3 Ekspresja sirtuiny 7

Do tej pory nie poznano roli SIRT7 w mięśniu sercowym i szkieletowym ssaków, ani nie badano wpływu krótkotrwałej diety restrykcyjnej i następującego karmienia *ad libitum* na ekspresję sirtuiny 7 na poziomie mRNA i białka w mięśniach ludzi czy zwierząt w podeszłym wieku. W niniejszej pracy młode kontrolne szczury miały istotnie wyższą ekspresję *Sirt7* w mięśniu sercowym, szkieletowym mieszanym oraz mięśniu szkieletowym białym (EDL) w porównaniu do starych zwierząt. W badaniach serca myszy podobne wyniki otrzymali Vakhrusheva i wsp. (2008a). Wyniki te wskazują, że poziom

mRNA *Sirt7* w mięśniach szczura obniża się w trakcie starzenia. Jedną z konsekwencji tego zjawiska mogłyby być zaburzenia w morfologii tkanki mięśnia sercowego. Vakhrusheva i wsp. (2008a) wykazali bowiem, że myszy *Sirt7*<sup>-/-</sup> charakteryzowały się hipertrofią i włóknieniem mięśnia sercowego, zwiększoną apoptozą kardiomiocytów, a także rozwojem kardiomiopatii zapalnej. W badaniach własnych z kolei zaobserwowano, że średnica włókien serca oraz udział tkanki łącznej w strukturze mięśnia sercowego starego szczura z grupy kontrolnej, były wyraźnie większe w porównaniu do osobnika młodego. Nie można zatem wykluczyć potencjalnego związku między obniżeniem poziomu sirtuiny 7 w mięśniu sercowym szczurów, a zmianami w jego strukturze, chociaż doświadczalna weryfikacja tego przypuszczenia wymagałaby analizy innych czynników regulacyjnych niż tylko KDR. Wprawdzie ekspresja genu *Sirt7* w mięśniu serca starych szczurów dwukrotnie wzrosła względem kontroli wskutek KDR i pozostała na tym samym poziomie podczas przywrócenia diety pełnej, to jednak analiza histologiczna skrawków serca szczura poddanego wspomnianym manipulacjom pokarmowym nie wykazała zmian w ilości włókien tkanki łącznej w porównaniu do starego szczura z grupy kontrolnej. Być może wydłużenie diety restrykcyjnej do kilku lub kilkunastu miesięcy pozwoliłoby ocenić ewentualne powiązanie ze zmianą ekspresji *Sirt7*, a oczekiwaną poprawą struktury mikroskopowej mięśnia serca. Zaburzenia morfologiczne mięśnia sercowego związane z hipertrofią czy obumieraniem kardiomiocytów powiązано bowiem z hiperacetylacją białka p53, które indukuje proces apoptozy (Alcendor i wsp. 2004; Vakhrusheva i wsp. 2008b). Z kolei białko p53 jest substratem dla SIRT1 i SIRT7, które prawdopodobnie na drodze zależnej od kofaktora NAD<sup>+</sup> powodują jego deacetylację i chronią tym samym przed zanikaniem kardiomiocytów (Vakhrusheva i wsp. 2008a). W badaniach własnych zauważono, że podczas KDR ekspresja genu *Sirt7* w sercach młodych i dwuletnich szczurów była pozytywnie skorelowana z ekspresją mRNA *Sirt1*, co może potwierdzać koncepcję Vakhrusheva i wsp. (2008a) o ewentualnym współdziałaniu obu sirtuin w sercu ssaków. Problem ten wymaga jednak dalszych badań.

W mięśniach szkieletowych ekspresja *Sirt7* wydaje się być zależna od typu mięśnia (mięśniowo – specyficzna) oraz podlegać zmianom pod wpływem manipulacji pokarmowych w sposób zależy od wieku. Zaobserwowano, że głodzenie obniża ekspresję genu *Sirt7*, natomiast 30-dniowa dieta restrykcyjna powoduje jej wzrost w mięśniu szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów. Szczególnie w MSM 5-miesięcznych zwierząt ekspresja sirtuiny 7 była prawie 4- i 2-krotnie większa podczas

KDR i przywrócenia karmienia po 2 dobach w porównaniu do dwuletnich osobników. Dane te wskazują, że SIRT7 może uczestniczyć w mechanizmach adaptacyjnych mięśni na warunki obniżonej podaży pokarmu. Problem ten wymaga jednak dalszych badań, co w oparciu o wyniki otrzymane w niniejszej pracy wydaje się w pełni uzasadnione.

## 7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW i WNIOSKI

1. W trakcie procesu starzenia szczura dochodzi do istotnych zmian niektórych potencjalnych regulatorów metabolizmu energetycznego w mięśniu serca i mięśniu szkieletowym, przy czym występują wyraźne różnice między tymi dwoma rodzajami mięśni poprzecznie prążkowanych.
2. Ekspresja genów **sirtuin**, NAD<sup>+</sup>- zależnych enzymów, jest zróżnicowana w mięśniu sercowym i szkieletowym młodych i starych szczurów kontrolnych (karmionych *ad libitum*- bez ograniczeń). W sercu poziom mRNA **Sirt1** był wyższy, **Sirt7** niższy i niezmienny w przypadku **Sirt3** u starych szczurów w porównaniu do młodych zwierząt. W mięśniu szkieletowym mieszanym (MSM) poziom mRNA **Sirt1** jest dwukrotnie wyższy u starych zwierząt, zaś **Sirt3** i **Sirt7** obniżony w porównaniu do młodych, dojrzałych szczurów.
3. W mięśniu sercowym starych kontrolnych szczurów ekspresja genu transportera glukozy 4 (**Glut4**), koaktywatora **Pgc-1 $\alpha$**  oraz receptora **Ppar- $\beta$**  była podobna jak u młodych zwierząt. W MSM starych szczurów natomiast, ekspresja **Glut4** oraz **Pgc-1 $\alpha$**  była dwukrotnie wyższa u starych zwierząt, a **Ppar- $\beta$**  niezmienna, w porównaniu do młodych szczurów.
4. Ekspresja genu **palmitoilotransferazy karnitynowej I (Cpt-I)** oraz aktywność enzymu w sercu i mięśniu szkieletowym mieszanym młodych i starych szczurów różniły się istotnie. W sercu poziom mRNA **Cpt-I** był podobny u zwierząt z obu grup wiekowych, ale aktywność enzymatyczna CPT-I była o połowę wyższa u starych szczurów. W MSM natomiast, ekspresja **Cpt-I** była dwukrotnie niższa u starych szczurów przy podobnym poziomie aktywności CPT-I jak u młodych zwierząt.
5. W badaniach zastosowano dwa modele modyfikacji żywieniowej: a) **głodzenie** przez 2 doby oraz, b) **30-dniową dietę restrykcyjną**, w której spożycie szczurów ograniczono do 60% dziennej dawki szczurów kontrolnych. Następnie zwierzęta były karmione *ad libitum* przez 2, 4 lub 6 dni. Analiza pobranych tkanek pozwoliła na uzyskanie szeregu oryginalnych obserwacji, szczególnie w odniesieniu do ekspresji genów sirtuin oraz innych badanych parametrów szczurów poddanych krótkotrwałej diecie restrykcyjnej (KDR).

6. **W mięśni sercowym** młodych szczurów KDR oraz następujące po niej karmienie dietą pełną obniżyły o około 50% poziom mRNA *Sirt1*, natomiast w sercu starych szczurów nie wywołały zmian w ekspresji genu. W obu grupach wiekowych KDR istotnie zwiększała ekspresję genu *Sirt3*. Z kolei poziom mRNA *Sirt7* nie zmieniał się pod wpływem KDR w mięśni sercowym młodych szczurów, ale ulegał podwyższeniu w sercu starych zwierząt.
7. **W mięśni szkieletowym mieszanym** ekspresja *Sirt1* pod wpływem KDR wyraźnie wzrosła u młodych, ale także, choć w mniejszym zakresie, u starych szczurów. Przywrócenie karmienia *ad libitum* spowodowało jej powrót do wartości kontrolnych. Poziom mRNA *Sirt3* uległ niewielkiemu obniżeniu pod wpływem KDR i następującym karmieniu *ad libitum* u młodych szczurów oraz nie zmienił się u starych zwierząt. Natomiast ekspresja *Sirt7* wzrosła pod wpływem KDR i obniżała się do wartości kontrolnych w momencie przywrócenia diety pełnej w MSM zwierząt z obu grup wiekowych.
8. Ekspresja genu transportera glukozy 4 (*Glut4*) pod wpływem manipulacji pokarmowych wydaje się być mięśniowo-specyficzna, a w przypadku mięśni szkieletowych zależna także od kompozycji włókien w nich zawartych.
9. **W mięśni sercowym** młodych szczurów KDR zwiększała ekspresję genu *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$*  oraz *Ppar- $\beta$* , przy czym poziomy ich mRNA wróciły do wartości kontrolnych pod wpływem przywrócenia karmienia *ad libitum*. W sercu starych szczurów natomiast, ani KDR ani karmienie dietą pełną nie wywołały istotnych zmian w ekspresji wymienionych genów.
10. Zupełnie inny, niż w mięśni sercowym, wpływ na poziomy mRNA *Glut4*, *Pgc-1 $\alpha$*  oraz *Ppar- $\beta$*  wywarła KDR oraz przywrócenie diety pełnej **w mieszanym mięśni szkieletowym**. U młodych szczurów KDR nie wpłynęła na ekspresję *Glut4* oraz *Pgc-1 $\alpha$* , natomiast przywrócenie karmienia wyraźnie obniżało poziomy ich mRNA. W MSM starych szczurów ekspresja *Glut4* oraz *Pgc-1 $\alpha$*  ulegała istotnemu obniżeniu pod wpływem KDR, zaś w trakcie przywrócenia karmienia wyraźnie rosła. Z kolei ekspresja genu receptora *Ppar- $\beta$*  nie zmieniała się istotnie u szczurów z obu grup wiekowych ani pod wpływem KDR ani karmienia dieta pełną.



11. **W mięśni sercowym** ekspresja genu *Cpt-1* wzrosła o około 50% pod wpływem KDR i powróciła do wartości kontrolnych po 2 dobach karmienia dietą pełną u zwierząt z obu grup wiekowych. Aktywność CPT-I istotnie wzrosła pod wpływem KDR i wróciła do poziomu kontroli w trakcie przywrócenia karmienia u młodych szczurów. W sercu strych zwierząt aktywność enzymu nie ulegała zmianie pod wpływem KDR, ale wzrosła pod wpływem dwudniowego karmienia.
12. **W mięśni szkieletowym mieszanym** młodych i starych szczurów ekspresja genu *Cpt-1* nie zmieniała się istotnie po KDR oraz po 2 dobach karmienia dietą pełną. Natomiast aktywność CPT-I obniżała się pod wpływem KDR i dwudniowego karmienia u młodych szczurów, ale nie ulegała zmianom w MSM starych zwierząt.
13. Wpływ KDR oraz przywrócenia karmienia *ad libitum* na badane parametry określano również w mięśni szkieletowym czerwonym (oksydacyjnym, wolnokurczliwym, *m. soleus*) oraz w mięśni szkieletowym białym (glikolitycznym, szybko kurczliwym, *m. extensor digitorum*). Uzyskano szereg oryginalnych obserwacji wskazujących na inną reaktywność poszczególnych rodzajów mięśni w odniesieniu do badanych parametrów zarówno w grupie młodych jak i starych szczurów.
14. Parametry lipidowe w surowicy krwi starych szczurów kontrolnych były wyraźnie podwyższone względem młodych zwierząt. KDR spowodowała istotne zmiany w poziomach lipidów (z wyjątkiem cholesterolu i Ch-HDL) w surowicy krwi starych szczurów, ale nie wpłynęła w istotny sposób na wskaźniki przemiany białkowej i węglowodanowej w obydwu grupach wiekowych.
15. W ciągu 6 dni karmienia po 30-dniowej restrykcji kalorycznej wystąpiła tendencja do podwojenia stężenia wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy krwi młodych i starych szczurów, prawdopodobnie wskutek zwiększonej lipolizy. Obserwacja ta wskazuje na konieczność wykonywania pod kontrolą ćwiczeń fizycznych u młodych i starych osobników poddanych KDR w celu zwiększenia utleniania kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych.

## WNIOSKI

1. Zarówno model głodzenia – karmienia, jak i model krótkotrwałej diety restrykcyjnej oraz następującego po niej karmienia dietą pełną przez 6 dni, ujawniają istnienie związanych ze starzeniem zaburzeń w mechanizmach adaptacji metabolizmu mięśnia sercowego oraz mięśni szkieletowych do ostrej lub przedłużonej restrykcji pokarmowej.
2. Metabolizm energetyczny w mięśniach szkieletowych różni się między szczurami młodymi a starymi. Trudno jest jednak jednoznacznie określić, czy uzyskane w pracy wyniki są rezultatem procesów starzenia jako takiego (*per se*), czy może innych czynników, jak otyłość starych szczurów, brak ruchliwości lub wszystkich tych procesów jednocześnie.
3. Obserwacje własne oraz innych badaczy wskazują na to, że KDR (w przeciwieństwie do głodzenia) może stanowić skuteczną metodę obniżenia masy ciała starych zwierząt i ludzi, bez wystąpienia zjawiska wzrostu masy ciała często obserwowanego po zaprzestaniu diety opartej o całkowitą głodówkę (tzw. „efekt jo-jo”). Jednak stosowanie KDR u ludzi przez kilka lub nawet kilkanaście miesięcy, szczególnie u osób w podeszłym wieku, powinno być prowadzone pod kontrolą lekarza lub dietetyka, tak aby nie wystąpiły szkodliwe dla zdrowia zaburzenia w przemianie białkowej.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abdul-Ghani M.A., DeFronzo R.A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010; 2010: 476279.
- Ahn B.H., Kim H.S., Song S., Lee I.H., Liu J., Vassilopoulos A., Deng C.X., Finkel T. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(38):14447-52.
- Akasaka Y., Tsunoda M., Ide T., Murakami K. Chronic leptin treatment stimulates lipid oxidation in immortalized and primary mouse skeletal muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1791: 103–109.
- Akasaka Y., Tsunoda M., Ogata T., Ide T., Murakami K. Direct evidence for leptin-induced lipid oxidation independent of long-form leptin receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1801: 1115–1122.
- Alcendor R.R., Kirshenbaum L.A., Imai S., Vatner S.F., Sadoshima J. Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2004; 95(10): 971-80.
- Alcendor R.R., Gao S., Zhai P., Zablocki D., Holle E., Yu X., Tian B., Wagner T., Vatner S.F., Sadoshima J. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res.* 2007; 100 (10):1512-21.
- Altun M., Besche H.C., Overkleeft H.S., Piccirillo R., Edelmann M.J., Kessler B.M., Goldberg A.L., Ulfhake B. Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 39597-39608.
- Amitani M., Asakawa A., Amitani H., Inui A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front Neurosci.* 2013;7:51.
- Andersen J.L. Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand. J. Med. Sci. Sports*, 2003; 13:40-47. (a)
- Anderson R. M., Latorre-Esteves M., Neves A. R., Lavu S., Medvedik O., Taylor C., Howitz K. T., Santos H., Sinclair D. A. Yeast life-span extension by calorie restriction is independent of NAD fluctuation. *Science.* 2003; 302(5653): 2124-26. (b)
- Anderson E.J., Lustig M.E., Boyle K.E., Woodlief T.L., Kane D.A., Lin C.T., Price J.W. 3rd, Kang L., Rabinovitch P.S., Szeto H.H., Houmard J.A., Cortright R.N., Wasserman D.H., Neuffer P.D. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.* 2009;119(3):573-81.
- Annoni G., Luvarà G., Arosio B., Gagliano N., Fiordaliso F., Santambrogio D., Jeremic G., Mircoli L., Latini R., Vergani C., Masson S. Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium. *Mech Ageing Dev.* 1998; 101(1-2):57-72.
- Anversa P., Palackal T., Sonnenblick E.H., Olivetti G., Meggs L.G., Capasso J.M. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res.* 1990;67(4):871-85.
- Arany Z., He H., Lin J., Hoyer K., Handschin C., Toka O., Ahmad F., Matsui T., Chin S., Wu P.H., Rybkin I.I., Shelton J.M., Manieri M., Cinti S., Schoen F.J., Bassel-Duby R., Rosenzweig

- A., Ingwall J.S., Spiegelman B.M. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* 2005;1(4):259-71.
- Atkinson L.L., Fischer M.A., Lopaschuk G.D. Leptin activates cardiac fatty acid oxidation independent of changes in the AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase-malonyl-CoA axis. *J Biol Chem.* 2002; 277(33):29424-30.
- Balagopal P., Schimke J.C., Ades P., Adey D., Nair K.S. Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001; 280: E203-208.
- Banks A.S., Kon N., Knight C., Matsumoto M., Gutiérrez-Juárez R., Rossetti L., Gu W., Accili D. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* 2008;8(4):333-41.
- Barazzoni R., Short K.R., Nair K.S. Effects of aging on mitochondrial DNA copy number and cytochrome c oxidase gene expression in rat skeletal muscle, liver, and heart. *J Biol Chem.* 2000;275(5):3343-7.
- Basu R., Breda E., Oberg A.L., Powell C.C., Dalla Man C., Basu A., Vittone J.L., Klee G.G., Arora P., Jensen M.D., Toffolo G., Cobelli C., Rizza R.A. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes.* 2003;52(7):1738-48.
- Baumgartner R.N., Koehler K.M., Gallagher D., Romero L., Heymsfield S.B., Ross R.R., Garry P.J., Lindeman R.D. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol.* 1998; 147(8): 755-63.
- Bellizzi D., Rose G., Cavalcante P., Covello G., Dato S., De Rango F., Greco V., Maggiolini M., Feraco E., Mari V., Franceschi C., Passarino G., De Benedictis G. A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics.* 2005; 85(2):258-63.
- Benton C.R., Han X.X., Febbraio M., Graham T.E., Bonen A. Inverse relationship between PGC-1alpha protein expression and triacylglycerol accumulation in rodent skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985).* 2006;100(2):377-83.
- Bitterman K.J., Medvedik O., Sinclair D.A. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):376-99.
- Boden G., Chen X., Mozzoli M., Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3419-23
- Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes.* 1997;46(1):3-10.
- Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2003;111(3):121-4.
- Boily G., Seifert E.L., Bevilacqua L., He X.H., Sabourin G., Estey C., Moffat C., Crawford S., Saliba S., Jardine K., Xuan J., Evans M., Harper M.E., McBurney M.W. SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One.* 2008;3(3):e1759.
- Bonen A., Parolin M.L., Steinberg G.R., Calles-Escandon J., Tandon N.N., Glatz J.F., Luiken J.J., Heigenhauser G.J., Dyck D.J. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2

- diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J.*, 2004; 18: 1144-1146.
- Bordone L., Cohen D., Robinson A., Motta M.C., van Veen E., Czopik A., Steele A.D., Crowe H., Marmor S., Luo J., Gu W., Guarente L. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell.* 2007;6(6):759-67.
- Boyle A.J., Shih H., Hwang J., Ye J., Lee B., Zhang Y., Kwon D., Jun K., Zheng D., Sievers R., Angeli F., Yeghiazarians Y., Lee R. Cardiomyopathy of aging in the mammalian heart is characterized by myocardial hypertrophy, fibrosis and a predisposition towards cardiomyocyte apoptosis and autophagy. *Exp Gerontol.* 2011;46(7):549-59.
- Braidy N., Guillemin G.J., Mansour H., Chan-Ling T., Poljak A., Grant R. Age related changes in NAD<sup>+</sup> metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One.* 2011;6(4):e19194.
- Bua E., Johnson J., Herbst A., Delong B., McKenzie D., Salamat S., Aiken J.M. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am. J. Hum. Genet.*, 2006; 79: 469-480.
- Cameron-Smith D., Burke L.M., Angus D.J., Tunstall R.J., Cox G.R., Bonen A., Hawley J.A., Hargreaves M. A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(2):313-8.
- Camps M., Castelló A., Muñoz P., Monfar M., Testar X., Palacín M., Zorzano A. Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem J.* 1992;282(Pt 3):765-72.
- Cantó C., Gerhart-Hines Z., Feige J.N., Lagouge M., Noriega L., Milne J.C., Elliott P.J., Puigserver P., Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* 2009;458(7241):1056-60.
- Carrascosa J.M., Andrés A., Ros M., Bogónez E., Arribas C., Fernández-Agulló T., De Solís A.J., Gallardo N., Martínez C. Development of insulinresistance during aging: involvement of central processes and role of adipokines. *Curr Protein PeptSci.* 2011;12(4):305-15.
- Cartee G.D. Myocardial GLUT-4 glucose transporter protein levels of rats decline with advancing age. *J Gerontol.* 1993; 48(4):B168-70.
- Cettour-Rose P., Samec S., Russell A.P., Summermatter S., Mainieri D., Carrillo-Theander C., Montani J.P., Seydoux J., Rohner-Jeanrenaud F., Dulloo A.G. Redistribution of glucose from skeletal muscle to adipose tissue during catch-up fat: a link between catch-up growth and later metabolic syndrome. *Diabetes.* 2005;54(3):751-6.
- Chanséaume E., Morio B. Potential mechanisms of muscle mitochondrial dysfunction in aging and obesity and cellular consequences. *Int. J. Mol. Sci.*, 2009; 10: 306-324.
- Chen D., Steele A.D., Lindquist S., Guarente L. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science.* 2005;310(5754):1641.
- Chen D., Bruno J., Easlon E., Lin S.J., Cheng H.L., Alt F.W., Guarente L. Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* 2008;22(13):1753-7.

- Cheng H.L., Mostoslavsky R., Saito S., Manis J.P., Gu Y., Patel P., Bronson R., Appella E., Alt F.W., Chua K.F. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(19):10794-9.
- Cheng L., Ding G., Qin Q., Huang Y., Lewis W., He N., Evans R.M., Schneider M.D., Brako F.A., Xiao Y., Chen Y.E., Yang Q. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$  deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nature Medicine* 2004,10: 1245 – 1250.
- Chin-Chance C., Polonsky K.S., Schoeller D.A. Twenty-four-hour leptin levels respond to cumulative short-term energy imbalance and predict subsequent intake. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85(8):2685-91.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
- Choi Y.S., Goto S., Ikeda I., Sugano M. Age-related changes in lipid metabolism in rats: the consequence of moderate food restriction. *Biochim Biophys Acta*. 1988;963(2):237-42.
- Chung J.Y., Kang H.T., Lee D.C., Lee H.R., Lee Y.J. Body composition and its association with cardiometabolic risk factors in the elderly: A focus on sarcopenic obesity. *Arch Gerontol Geriatr*. 2013;56(1):270-8. Epub 2012 Oct 15.
- Colman R.J., Anderson R.M., Johnson S.C., Kastman E.K., Kosmatka K.J., Beasley T.M., Allison D.B., Cruzen C., Simmons H.A., Kemnitz J.W., Weindruch R.: Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science*. 2009; 325: 201-204.
- Conley K.E., Jubrias S.A., Esselman P.C. Oxidative capacity and ageing in human muscle. *J. Physiol.*, 2000; 526: 203-210.
- Conley K.E., Amara C.E., Jubrias S.A., Marcinek D.J. Mitochondrial function, fiber types and ageing: new insights from human muscle in vivo. *Exp Physiol*. 2007; 92(2): 333-9.
- Coon P.J., Rogus E.M., Drinkwater D., Muller D.C., Goldberg A.P. Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992;75(4):1125-32.
- Corpeleijn E., Saris W.H., Blaak E.E. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev*. 2009;10(2):178-93.
- Cruz-Jentoft A.J., Baeyens J.P., Bauer J.M., Boirie Y., Cederholm T., Landi F., Martin F.C., Michel J.P., Rolland Y., Schneider S.M., Topinková E., Vandewoude M., Zamboni M. European Working Group on Sarcopenia in Older People: Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, 2010; 39: 412-423.
- Dai D.F., Chen T., Johnson S.C., Szeto H., Rabinovitch P.S. Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(12):1492-526.
- de Heredia F.P., Larque E., Portillo M.P., Canteras M., Zamora S., Garaulet M. Age-related changes in fatty acids from different adipose depots in rat and their association with adiposity and insulin. *Nutrition*. 2008;24(10):1013-22.

- De Solís A.J., Fernández-Agulló T., García-SanFrutos M., Pérez-Pardo P., Bogónez E., Andrés A., Ros M., Carrascosa J.M. Impairment of skeletal muscle insulin action with aging in Wistar rats: role of leptin and caloric restriction. *Mech Ageing Dev.* 2012;133(5):306-16.
- De Ruiter C.J., Habets P.E., de Haan A., Sargeant A.J. In vivo IIX and IIB fiber recruitment in gastrocnemius muscle of the rat is compartment related. *J Appl Physiol* (1985). 1996;81(2):933-42.
- Dean D.J., Brozinick J.T. Jr, Cushman S.W., Cartee G.D. Calorie restriction increases cell surface GLUT-4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Am. J. Physiol.*, 1998; 275: E957-964.
- Denu J.M. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci.* 2003; 28(1):41-8.
- Deschenes M.R. Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports Med.* 2004; 34(12): 809-24.
- Després J.P., Lemieux I., Dagenais G.R., Cantin B., Lamarche B. HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the Québec cardiovascular study. *Atherosclerosis.* 2000;153(2):263-72.
- Dirks A., Leeuwenburgh C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2002; 282: R519-527.
- Dresner A., Laurent D., Marcucci M., Griffin M.E., Dufour S., Cline G.W., Slezak L.A., Andersen D.K., Hundal R.S., Rothman D.L., Petersen K.F., Shulman G.I. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 1999;103(2):253-9.
- Dziewulska A., Dobrzyń P., Dobrzyń A. Rola kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) w regulacji metabolizmu mięśni szkieletowych. *Postepy Hig Med. Dosw.* 2010;64:513-521.
- Eaton S., Bartlett K., Quant P.A. Carnitine palmitoyl transferase I and the control of beta-oxidation in heart mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285(2):537-9.
- Einarsson K., Nilsell K., Leijd B., Angelin B. Influence of age on secretion of cholesterol and synthesis of bile acids by the liver. *N Engl J Med.* 1985;313(5):277-82.
- Erion D.M., Yonemitsu S., Nie Y., Nagai Y., Gillum M.P., Hsiao J.J., Iwasaki T., Stark R., Weismann D., Yu X.X., Murray S.F., Bhanot S., Monia B.P., Horvath T.L., Gao Q., Samuel V.T., Shulman G.I. SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(27):11288-93.
- Escrivá F., Gavete M.L., Fermín Y., Pérez C., Gallardo N., Alvarez C., Andrés A., Ros M., Carrascosa J.M. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol.* 2007;194(1):131-41.
- Faulkner J.A., Larkin L.M., Clafin D.R., Brooks S.V. Age-related changes in the structure and function of skeletal muscles. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 2007; 34: 1091-1096.
- Feige J.N., Lagouge M., Canto C., Strehle A., Houten S.M., Milne J.C., Lambert P.D., Matakis C., Elliott P.J., Auwerx J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* 2008;8(5):347-58.

- Fernández-Galaz C., Fernández-Agulló T., Pérez C., Peralta S., Arribas C., Andrés A., Carrascosa J.M., Ros M. Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in wistar rats. *Diabetologia*. 2002;45(7):997-1003.
- Fernandez-Marcos P.J., Jeninga E.H., Canto C., Harach T., de Boer V.C., Andreux P., Moullan N., Pirinen E., Yamamoto H., Houten S.M., Schoonjans K., Auwerx J. Muscle or liver-specific Sirt3 deficiency induces hyperacetylation of mitochondrial proteins without affecting global metabolic homeostasis. *Sci Rep*. 2012;2:425.
- Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C., Grummt I., Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*. 2006;20(9):1075-80.
- Forman D.E., Cittadini A., Azhar G., Douglas P.S., Wei J.Y. Cardiac morphology and function in senescent rats: gender-related differences. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 30(7):1872-7.
- Franch J., Knudsen J., Ellis B.A., Pedersen P.K., Cooney G.J., Jensen J. Acyl-CoA binding protein expression is fiber type- specific and elevated in muscles from the obese insulin-resistant Zucker rat. *Diabetes*. 2002;51(2):449-54.
- Frier B.C., Jacobs R.L., Wright D.C. Interactions between the consumption of a high-fat diet and fasting in the regulation of fatty acid oxidation enzyme gene expression: an evaluation of potential mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):R212-21.
- Frontera W.R., Hughes V.A., Fielding R.A., Fiatarone M.A., Evans W.J., Roubenoff R. Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol*. 2000; 88(4): 1321-6.
- Frye R.A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;273(2):793-8.
- Fujino T., Kondo J., Ishikawa M., Morikawa K., Yamamoto T.T. Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem*. 2001;276(14):11420-6.
- Fulco M., Cen Y., Zhao P., Hoffman E.P., McBurney M.W., Sauve A.A., Sartorelli V. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell*. 2008;14(5):661-73.
- Fulle S., Protasi F., Di Tano G., Pietrangelo T., Beltramin A., Boncompagni S., Vecchiet L., Fanò G. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp Gerontol*. 2004; 39(1): 17-24.
- Gabriely I., Ma X.H., Yang X.M., Atzmon G., Rajala M.W., Berg A.H., Scherer P., Rossetti L., Barzilai N. Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes*. 2002;51(10):2951-8.
- Gaster M., Poulsen P., Handberg A., Schroder H.D., Beck-Nielsen H. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2000; 278: E910-916.
- Gerhart-Hines Z., Rodgers J T., Bare O., Lerin C., Kim S.H., Mostoslavsky R., Alt F W., Wu Z., Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *Embo J*. 2007; 26: 1913-1923.
- Ghezzi A.C., Cambri L.T., Botezelli J.D., Ribeiro C., Dalia R.A., de Mello M.A. Metabolic syndrome markers in wistar rats of different ages. *Diabetol Metab Syndr*. 2012;4(1):16.



- Gogga P., Karbowska J., Meissner W., Kochan Z. Rola leptyny w regulacji metabolizmu lipidów i węglowodanów. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2011; 65: 255-262.
- Goldspink D.F. Ageing and activity: their effects on the functional reserve capacities of the heart and vascular smooth and skeletal muscles. *Ergonomics*, 2005; 48: 1334-1351.
- Gómez L.A., Heath S.H., Hagen T.M. Acetyl-L-carnitine supplementation reverses the age-related decline in carnitinepalmitoyltransferase 1 (CPT1) activity in interfibrillar mitochondria without changing the L-carnitine content in the rat heart. *Mech Ageing Dev.* 2012;133(2-3):99-106.
- Goodpaster B.H., Kelley D.E., Wing R.R., Meier A., Thaete F.L. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes*. 1999;48(4):839-47.
- Goodpaster B.H., Theriault R., Watkins S.C., Kelley D.E. Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism*. 2000;49(4):467-72.
- Goto S. Health span extension by later-life caloric or dietary restriction: a view based on rodent studies. *Biogerontology*. 2006; 7(3):135-8.
- Gredilla R.: DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging. *J. Aging Res.*, 2010; 2011: 257093.
- Grob A., Roussel P., Wright J.E., McStay B., Hernandez-Verdun D., Sirri V.: Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 4):489-98.
- Guan K.L., Xiong Y.: Regulation of intermediary metabolism by protein acetylation. *Trends Biochem Sci*. 2011; 36(2):108-16.
- Guerrero M., Guiu-Comadevall M., Cadefau J.A., Parra J., Balius R., Estruch A., Rodas G., Bedini J.L., Cussó R.: Fast and slow myosins as markers of muscle injury. *Br. J. Sports Med.*, 2008; 42: 581-584.
- Gugliucci A., Kotani K., Taing J., Matsuoka Y., Sano Y., Yoshimura M., Egawa K., Horikawa C., Kitagawa Y., Kiso Y., Kimura S., Sakane N. Short-term low calorie diet intervention reduces serum advanced glycation end products in healthy overweight or obese adults. *Ann NutrMetab*. 2009; 54(3):197-201.
- Gulve E.A., Henriksen E.J., Rodnick K.J., Youn J.H., Holloszy J.O. Glucose transporters and glucose transport in skeletal muscles of 1- to 25-mo-old rats. *Am J Physiol*. 1993;264(3 Pt 1):E319-27.
- Hafner A.V., Dai J., Gomes A.P., Xiao C.Y., Palmeira C.M., Rosenzweig A., Sinclair D.A. Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy. *Aging (Albany NY)*. 2010; 2 (12):914-23.
- Hagen T.M., Moreau R., Suh J.H., Visioli F. Mitochondrial decay in the aging rat heart: evidence for improvement by dietary supplementation with acetyl-L-carnitine and/or lipoic acid. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959:491-507.
- Haigis M.C., Guarente L.P. Mammalian sirtuins – emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes and Development* 2006; 20: 2913–2921.
- Hallows W.C, Lee S., Denu J.M. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(27):10230-5.

- Hammer S., Snel M., Lamb H.J., Jazet I.M., van der Meer R.W., Pijl H., Meinders E.A., Romijn J.A., de Roos A., Smit J.W. Prolonged caloric restriction in obese patients with type 2 diabetes mellitus decreases myocardial triglyceride content and improves myocardial function. *J Am CollCardiol.* 2008; 52(12):1006-12.
- Hansford R.G. Lipid oxidation by heart mitochondria from young adult and senescent rats. *Biochem J.* 1978; 170(2):285-95.
- Haramizu S., Ota N, Hase T, Murase T. Aging-associated changes in physical performance and energy metabolism in the senescence-accelerated mouse. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.* 2011;66(6):646-55.
- Haugaard S.B., Vaag A., Høy C.E., Madsbad S. Desaturation of skeletal muscle structural and depot lipids in obese individuals during a very-low-calorie diet intervention. *Obesity (Silver Spring).* 2007; 15(1):117-25.
- Hebert A.S., Dittenhafer-Reed K.E., Yu W., Bailey D.J., Selen E.S., Boersma M.D., Carson J.J., Tonelli M., Balloon A.J., Higbee A.J., Westphall M.S., Pagliarini D.J., Prolla T.A., Assadi-Porter F., Roy S., Denu J.M., Coon J.J. Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell.* 2013;49(1):186-99.
- Hiona A., Leeuwenburgh C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp. Gerontol.*, 2008; 43: 24-33
- Hirschey M.D., Shimazu T., Goetzman E., Jing E., Schwer B., Lombard D.B., Grueter C.A., Harris C., Biddinger S., Ilkayeva O.R., Stevens R.D., Li Y., Saha A.K., Ruderman N.B., Bain J.R., Newgard C.B., Farese R.V. Jr, Alt F.W., Kahn C.R., Verdin E. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature.* 2010; 464 (7285):121-5.
- Holloszy J.O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. *J PhysiolPharmacol.* 2008;59 Suppl 7:5-18.
- Houmard J.A., Weidner M.D., Dolan P.L., Leggett-Frazier N., Gavigan K.E., Hickey M.S., Tyndall G.L., Zheng D., Alshami A., Dohm G.L. Skeletal muscle GLUT4 protein concentration and aging in humans. *Diabetes.* 1995;44(5):555-60.
- Houtkooper R.H., Pirlinen E., Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):225-38.
- Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., Sinclair D.A. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003;425(6954):191-6.
- Hsu C.P., Odewale I., Alcendor R.R., Sadoshima J. Sirt1 protects the heart from aging and stress. *Biol Chem.* 2008;389(3):221-31.
- Hsu C.P., Zhai P., Yamamoto T., Maejima Y., Matsushima S., Hariharan N., Shao D., Takagi H., Oka S., Sadoshima J. Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation.* 2010;122(21):2170-82.
- Ijuin T., Takenawa T. Regulation of insulin signaling and glucose transporter 4 (GLUT4) exocytosis by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) phosphatase, skeletal muscle,

- and kidney enriched inositol polyphosphate phosphatase (SKIP). *J Biol Chem.* 2012;287(10):6991-9.
- Imai S., Armstrong C. M., Kaeberlein M., Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature.* 2000; 403 (6771): 795-800.
- Ishiki M., Klip A. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology.* 2005;146(12):5071-8.
- Jang S.Y., Kang H.T., Hwang E.S. Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD<sup>+</sup>/NADH ratio and SIRT1 protein activation. *J Biol Chem.* 2012;287(23):19304-14.
- Jaromowska M., Górski J. Effect of fasting on skeletal muscle triglyceride content. *Experientia.* 1985;41(3):357-8.
- Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;967:379-88.
- Jing E., Emanuelli B., Hirschey M.D., Boucher J., Lee K.Y., Lombard D., Verdin E.M., Kahn C.R.: Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(35):14608-13.
- Johnstone A.M. Fasting - the ultimate diet? *Obes Rev.* 2007;8(3):211-22.
- Joseph A.M., Adihetty P.J., Buford T.W., Wohlgemuth S.E., Lees H.A., Nguyen L.M., Aranda J.M., Sandesara B.D., Pahor M., Manini T.M., Marzetti E., Leeuwenburgh C. The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. *Aging Cell.* 2012;11(5):801-9.
- Joseph A.M., Malamo A.G., Silvestre J., Wawrzyniak N., Carey-Love S., Nguyen L.M., Dutta D., Xu J., Leeuwenburgh C., Adihetty P.J. Short-term caloric restriction, resveratrol, or combined treatment regimens initiated in late-life alter mitochondrial protein expression profiles in a fiber-type specific manner in aged animals. *Exp Gerontol.* 2013;48(9):858-68.
- Kaczor J.J., Ziółkowski W., Antosiewicz J., Hac S., Tarnopolsky M.A., Popinigis J. The effect of aging on anaerobic and aerobic enzyme activities in human skeletal muscle. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.* 2006; 61 (4):339-44.
- Kaeberlein M., McDonagh T., Heltweg B., Hixon J., Westman E.A., Caldwell S.D., Napper A., Curtis R., DiStefano P.S., Fields S., Bedalov A., Kennedy B.K. Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem.* 2005;280(17):17038-45.
- Kanfi Y., Peshti V., Gozlan Y.M., Rathaus M., Gil R., Cohen H.Y. Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* 2008;582(16):2417-23.
- Karavidas A., Lazaros G., Tsiachris D., Pyrgakis V. Aging and the cardiovascular system. *Hellenic J Cardiol.* 2010;51(5):421-7.
- Kates A.M., Herrero P., Dence C., Soto P., Srinivasan M., Delano D.G., Ehsani A., Gropler R.J. Impact of aging on substrate metabolism by the human heart. *J Am CollCardiol.* 2003; 41(2):293-9.
- Kelley D.E., Goodpaster B., Wing R.R., Simoneau J.A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am. J. Physiol.*, 1999; 277: E1130-1141.

- Kelley D.E., Goodpaster B.H. Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care*. 2001;24(5):933-41.
- Keung W., Cadete V.J., Palaniyappan A., Jablonski A., Fischer M., Lopaschuk G.D. Intracerebroventricular leptin administration differentially alters cardiac energy metabolism in mice fed a low-fat and high-fat diet. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2011; 57: 103–113.
- Khan L.U., Ahmed J., Khan S., Macfie J. Refeeding syndrome: a literature review. *Gastroenterol Res Pract*. 2011;2011. pii: 410971.
- Kieć-Wilk B., Petkow-Dimitrow P., Kwaśniak M., Dembińska-Kieć A. Role of impaired calcium homeostasis in the development of cardiac hypertrophy. *Kardiol Pol*. 2009;67(12):1396-402.
- Kim J.Y., Kim D.H., Choi J., Park J.K., Jeong K.S., Leeuwenburgh C., Yu B.P., Chung H.Y. Changes in lipid distribution during aging and its modulation by calorie restriction. *Age (Dordr)*, 2009; 31: 127-142.
- Kmieć Z., Pokrywka L., Kotlarz G., Kubasik J., Szutowicz A., Mysliwski A. Effects of fasting and refeeding on serum leptin, adiponectin and free fatty acid concentrations in young and old male rats. *Gerontology*. 2005; 51(6): 357-62.
- Kolaczynski J.W., Ohannesian J.P., Considine R.V., Marco C.C., Caro J.F. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81(11): 4162-5.
- Koltai E., Szabo Z., Atalay M., Boldogh I., Naito H., Goto S., Nyakas C., Radak Z. Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(1):21-8.
- Kong X., Wang R., Xue Y., Liu X., Zhang H., Chen Y., Fang F., Chang Y. Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One*. 2010;5(7):e11707.
- Konturek S., Pawlik W. *Fizjologia człowieka. Podręcznik dla studentów medycyny: Fizjologia układu krążenia*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2007: 197- 271.
- Kovacheva E.L., Hikim A.P., Shen R., Sinha I., Sinha-Hikim I. Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology*, 2010; 151: 628-638.
- Kraegen E.W., Sowden J.A., Halstead M.B., Clark P.W., Rodnick K.J., Chisholm D.J., James D.E. Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochem J*. 1993;295(Pt 1):287-93.
- Książek K., Witowski J. Zaburzenia działania insuliny a starzenie się człowieka. *Postepy Hig Med Dosw. (online)*, 2008; 62: 263-271.
- Kwak H.B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil*. 2013;9(2):212-219.
- Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., Geny B., Laakso M., Puigserver P., Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006;127(6):1109-1122.

- Lakatta E.G., Sollott S.J. Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2002;132(4):699-721.
- Lane M.A., Ingram D.K., Roth G.S. Calorie restriction in nonhuman primates: effects on diabetes and cardiovascular disease risk. *Toxicol Sci.* 1999;52(2 Suppl):41-8.
- Lang T., Streeper T., Cawthon P., Baldwin K., Taaffe D.R., Harris T.B. Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporos Int.* 2010; 21(4): 543-59.
- Lanza I.R., Short D.K., Short K.R., Raghavakaimal S., Basu R., Joyner M.J., McConnell J.P., Nair K.S. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes.* 2008;57(11):2933-42.
- Larkin L.M., Reynolds T.H., Supiano M.A., Kahn B.B., Halter J.B. Effect of aging and obesity on insulin responsiveness and glut-4 glucose transporter content in skeletal muscle of Fischer 344 x Brown Norway rats. *J Gerontol A BiolSci Med Sci.* 2001;56(11):B486-92.
- Law I.K., Liu L., Xu A., Lam K.S., Vanhoutte P.M., Che C.M., Leung P.T., Wang Y. Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins. *Proteomics.* 2009;9(9):2444-56.
- Ławniczak A., Kmieć Z. Age-related changes of skeletal muscles: physiology, pathology and regeneration. *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 2012, 19;66: 392-400.
- Lee C.K., Allison D.B., Brand J., Weindruch R., Prolla T.A. Transcriptional profiles associated with aging and middle age-onset caloric restriction in mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):14988-93.
- Lee M.J., Wang Y., Ricci M.R., Sullivan S., Russell C.D., Fried S.K. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E858–E864.
- Lehman J.J., Boudina S., Banke N.H., Sambandam N., Han X., Young D.M., Leone T.C., Gross R.W., Lewandowski E.D., Abel E.D., Kelly D.P. The transcriptional coactivator PGC-1alpha is essential for maximal and efficient cardiac mitochondrial fatty acid oxidation and lipid homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(1):H185-96.
- Lexell L., Taylor C.C., Sjostrom M. What is the cause of ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastuslateralis muscle from 15- to human 83-year-old men. *J. Neurol. Sci.*, 1988; 84: 275-294.
- Li H., Matheny M., Nicolson M., Tümer N., Scarpace P.J. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes.* 1997;46(12):2035-9.
- Liang H., Ward W.F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv. Physiol. Educ.* 2006; 30(4):145-51.
- Liepinsh E., Makrečka M., Kuka J., Makarova E., Vilskersts R., Cirule H., Sevostjanovs E., Grinberga S., Pugovics O., Dambrova M. The heart is better protected against myocardial infarction in the fed state compared to the fasted state. *Metabolism.* 2014;63(1):127-36.
- Lin J.L., Asano T., Shibasaki Y., Tsukuda K., Katagiri H., Ishihara H., Takaku F., Oka Y. Altered expression of glucose transporter isoforms with aging in rats--selective decrease in GluT4 in the fat tissue and skeletal muscle. *Diabetologia.* 1991;34(7):477-82.
- Lin L., Chen K., Khalek W.A., Ward J.L. 3rd, Yang H., Chabi B., Wrutniak-Cabello C., Tong Q. Regulation of Skeletal Muscle Oxidative Capacity and Muscle Mass by SIRT3. *PLoS One.* 2014;9(1):e85636.

- Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 2000;289(5487):2126-8.
- Lin S.J., Kaeberlein M., Andalis A.A., Sturtz L.A., Defossez P.A., Culotta V.C., Fink G.R., Guarente L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*. 2002; 418(6895):344-8.
- Linford N.J., Beyer R.P., Gollahon K., Krajcik R.A., Malloy V.L., Demas V., Burmer G.C., Rabinovitch P.S. Transcriptional response to aging and caloric restriction in heart and adipose tissue. *Aging Cell*. 2007; 6(5):673-88.
- Liu H.Y., Zheng G., Zhu H., Woldegiorgis G. Hormonal and nutritional regulation of muscle carnitine palmitoyltransferase I gene expression in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2007;465(2):437-42.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
- Lombard D.B., Alt F.W., Cheng H.L., Bunkenborg J., Streeper R.S., Mostoslavsky R., Kim J., Yancopoulos G., Valenzuela D., Murphy A., Yang Y., Chen Y., Hirschey M.D., Bronson R.T., Haigis M., Guarente L.P., Farese R.V. Jr, Weissman S., Verdin E., Schwer B. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(24): 8807-14.
- Longo V.D. Linking sirtuins, IGF-I signaling, and starvation. *Experimental Gerontology*, 2009; 44: 70-74.
- López-Lluch G., Hunt N., Jones B., Zhu M., Jamieson H., Hilmer S., Cascajo M.V., Allard J., Ingram D.K., Navas P., de Cabo R. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1768-73.
- Łukaszuk B., Chabowski A. Rola mitochondrialnych transporterów kwasów tłuszczowych w patogenezie insulinooporności komórek mięśniowych. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, 2010; 64:31-37.
- Madrazo J.A., Kelly D.P. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(6):968-75.
- Marzetti E., Hwang J.C., Lees H.A., Wohlgemuth S.E., Dupont-Versteegden E.E., Carter C.S., Bernabei R., Leeuwenburgh C. Mitochondrial death effectors: relevance to sarcopenia and disuse muscle atrophy. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2010; 1800: 235-244.
- Marzolo M., Pagano C., Granzotto M., Calcagno A., Ferretti E., Ricquier D., Vettor R., Federspil G. Changes in muscle UCP3 expression and serum leptin in food restricted and refeed rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24 Suppl 2:S131-3.
- Masternak M.M., Al-Regaiey K.A., Del Rosario Lim M.M., Jimenez-Ortega V., Panici J.A., Bonkowski M.S., Kopchick J.J., Wang Z., Bartke A. Caloric restriction and growth hormone receptor knockout: effects on expression of genes involved in insulin action in the heart. *Exp Gerontol*. 2006; 41(4):417-29.
- Mattison J.A., Roth G.S., Beasley T.M., Tilmont E.M., Handy A.M., Herbert R.L., Longo D.L., Allison D.B., Young J.E., Bryant M., Barnard D., Ward W.F., Qi W., Ingram D.K., de Cabo R. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*. 2012;489(7415):318-21.

- McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A. The effect of restricted growth upon the length of life and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 1935; 10: 63–79.
- McMillin J.B., Taffet G.E., Taegtmeier H., Hudson E.K., Tate C.A. Mitochondrial metabolism and substrate competition in the aging Fischer rat heart. *Cardiovasc Res.* 1993;27(12):2222-8.
- Michael L.F., Wu Z., Cheatham R.B., Puigserver P., Adelmant G., Lehman J.J., Kelly D.P., Spiegelman B.M. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):3820-5.
- Michishita E., Park J.Y., Burneskis J.M., Barrett J.C., Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell.* 2005;16(10):4623-35.
- Milne J.C., Lambert P.D., Schenk S., Carney D.P., Smith J.J., Gagne D.J., Jin L., Boss O., Perni R.B., Vu C.B., Bemis J.E., Xie R., Disch J.S., Ng P.Y., Nunes J.J., Lynch A.V., Yang H., Galonek H., Israelian K., Choy W., Iffland A., Lavu S., Medvedik O., Sinclair D.A., Olefsky J.M., Jirousek M.R., Elliott P.J., Westphal C.H. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature.* 2007;450(7170):712-6.
- Minokoshi Y., Kim Y.B., Peroni O.D., Fryer L.G., Müller C., Carling D., Kahn B.B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2002;415(6869):339-43.
- Montori-Grau M., Minor R., Lerin C., Allard J., Garcia-Martinez C., de Cabo R., Gómez-Foix A.M. Effects of aging and calorie restriction on rat skeletal muscle glycogen synthase and glycogen phosphorylase. *Exp. Gerontol.*, 2009; 44: 426-433.
- Moreau R., Heath S.H., Doneanu C.E., Harris R.A., Hagen T.M. Age-related compensatory activation of pyruvate dehydrogenase complex in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325(1):48-58.
- Moustafa S.A. Age-dependent changes in haematology and clinical chemistry parameters in the rat. *Biomedical Letters.* 1997; 55(218): 83-90.
- Muoio D.M., MacLean P.S., Lang D.B., Li S., Houmard J.A., Way J.M., Winegar D.A., Corton J.C., Dohm G.L., Kraus W.E. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem.* 2002;277(29):26089-97.
- Muoio D.M., Way J.M., Tanner C.J., Winegar D.A., Kliewer S.A., Houmard J.A., Kraus W.E., Dohm G.L. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes.* 2002;51(4):901-9.
- Nagatomo F., Gu N., Fujino H., Takeda I., Tsuda K., Ishihara A. Skeletal muscle characteristics of rats with obesity, diabetes, hypertension, and hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2009;16(5):576-85.
- Narici M.V., Maffulli N. Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br. Med. Bull.*, 2010; 95: 139-159.
- Neely J.R., Morgan H.E. Relationship between carbohydrate metabolism and energy balance of heart muscle. *Ann Rev Physiol*, 36 (1974), 413–459.

- Nemoto S., Fergusson M.M., Finkel T. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*. 2004;306(5704):2105-8.
- Niemann B., Chen Y., Issa H., Silber R.E., Rohrbach S. Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: role of mitochondria. *Cardiovasc Res*. 2010;88(2):267-76.
- Nistiar F., Racz O., Lukacinova A., Hubkova B., Novakova J., Lovasova E., Sedlakova E. Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2012;47(9):1224-33.
- Norton L., Parr T., Bardsley R.G., Ye H., Tsintzas K. Characterization of GLUT4 and calpain expression in healthy human skeletal muscle during fasting and refeeding. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;189(3):233-40.
- Odiet J.A., Boerrigter M.E., Wei J.Y. Carnitine palmitoyl transferase-I activity in the aging mouse heart. *Mech Ageing Dev*. 1995;79(2-3):127-36.
- Okoshi M.P., Okoshi K., Pai V.D., Pai-Silva M.D., Matsubara L.S., Cicogna A.C. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food-restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79(9):754-60.
- Onyango P., Celic I., McCaffery J.M., Boeke J.D., Feinberg A.P. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13653-8.
- Ou X., Chae H.D., Wang R.H., Shelley W. C., Cooper S., Taylor T., Kim Y.J., Deng C.X., Yoder M. C., Broxmeyer H. E. SIRT1 deficiency compromises mouse embryonic stem cell hematopoietic differentiation, and embryonic and adult hematopoiesis in the mouse. *Blood*. 2011; 117(2): 440-50.
- Pagano C., Calcagno A., Granzotto M., Calabrese F., Thiene G., Federspil G., Vettor R. Heart lipid accumulation in obese non-diabetic rats: effect of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18(3):189-97.
- Palacios O.M., Carmona J.J., Michan S., Chen K.Y., Manabe Y., Ward J.L. 3rd, Goodyear L.J., Tong Q. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(9):771-83.
- Paradies G., Ruggiero F.M., Petrosillo G., Gadaleta M.N., Quagliariello E. Carnitine-acylcarnitine translocase activity in cardiac mitochondria from aged rats: the effect of acetyl-L-carnitine. *Mech Ageing Dev*. 1995;84(2):103-12.
- Parini P., Angelin B., Rudling M. Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging: reversal of hypercholesterolemia by growth hormone treatment in old rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):832-9.
- Parise G., De Lisio M. Mitochondrial theory of aging in human age-related sarcopenia. *Interdiscip. Top. Gerontol.*, 2010; 37: 142-156.
- Park E.A., Cook G.A. Differential regulation in the heart of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase-I muscle and liver isoforms. *Mol Cell Biochem*. 1998;180(1-2):27-32.
- Park S.Y., Kim Y.W., Kim J.E., Kim J.Y. Age-associated changes in fat metabolism in the rat and its relation to sympathetic activity. *Life Sci*. 2006;79(23):2228-33.



- Park S.Y., Kim H.Y., Lee J.H., Yoon K.H., Chang M.S., Park S.K. The age-dependent induction of apoptosis-inducing factor (AIF) in the human semitendinosus skeletal muscle. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2010; 15: 1-12.
- Pauli J.R., Ropelle E.R., Cintra D.E., De Souza C.T., da Silva A.S., Moraes J.C., Prada P.O., de Almeida Leme J.A., Luciano E., Velloso L.A., Carvalheira J.B., Saad M.J. Acute exercise reverses aged-induced impairments in insulin signaling in rodent skeletal muscle. *Mech Ageing Dev.* 2010;131(5):323-9.
- Pérez C., Fernández-Galaz C., Fernández-Agulló T., Arribas C., Andrés A., Ros M., Carrascosa J.M. Leptin impairs insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes.* 2004;53(2):347-53.
- Petersen K.F., Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D.L., DiPietro L., Cline G.W., Shulman G.I. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*, 2003; 300: 1140-1142.
- Pette D., Staron R.S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.*, 2000; 50: 500-509.
- Phillips T., Leeuwenburgh C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *FASEB J.*, 2005; 19: 668-670.
- Pilegaard H., Saltin B., Neufer P.D. Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. *Diabetes.* 2003; 52(3):657-62.
- Pillai V.B., Sundaresan N.R., Jeevanandam V., Gupta M.P. Mitochondrial SIRT3 and heart disease. *Cardiovasc Res.* 2010;88(2):250-6. (a)
- Pillai V.B., Sundaresan N.R., Kim G., Gupta M., Rajamohan S.B., Pillai J.B., Samant S., Ravindra P.V., Isbatan A., Gupta M.P. Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J Biol Chem.* 2010; 285(5):3133-44. (b)
- Power G.W., Newsholme E.A. Dietary fatty acids influence the activity and metabolic control of mitochondrial carnitinepalmitoyltransferase I in rat heart and skeletal muscle. *J Nutr.* 1997;127(11):2142-50.
- Qiu X., Brown K., Hirschey M.D., Verdin E., Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* 2010;12(6):662-7.
- Raffaello A., Milan G., Masiero E., Carnio S., Lee D., Lanfranchi G., Goldberg A.L., Sandri M. JunB transcription factor maintains skeletal muscle mass and promotes hypertrophy. *J Cell Biol.* 2010;191(1):101-13.
- Rasmussen B.B., Holmbäck U.C., Volpi E., Morio-Liondore B., Paddon-Jones D., Wolfe R.R. Malonyl coenzyme A and the regulation of functional carnitine palmitoyltransferase-1 activity and fat oxidation in human skeletal muscle. *J Clin Invest.* 2002;110(11):1687-93.
- Roman E.A., Reis D., Romanatto T., Maimoni D., Ferreira E.A., Santos G.A., Torsoni A.S., Velloso L.A., Torsoni M.A. Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1a activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2010; 314: 62-69.
- Rosenberg I.H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J. Nutr.*, 1997; 127: 990-991.
- Rossi P., Marzani B., Giardina S., Negro M., Marzatico F. Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events. *Curr. Aging Sci.*, 2008; 1: 182-191.

- Rowland A.F., Fazakerley D.J., James D.E. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic*. 2011;12(6):672-81.
- Ryall J.G., Schertzer J.D., Lynch G.S. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology*, 2008; 9: 213-228.
- Samuel V.T., Petersen K.F., Shulman G.I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet*, 2010; 375: 2267-2277.
- Sandri M., Lin J., Handschin C., Yang W., Arany Z.P., Lecker S.H., Goldberg A.L., Spiegelman B.M.: PGC-1 $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(44):16260-5.
- Schenk S., Horowitz J.F. Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(2):E254-60.
- Scher M.B., Vaquero A., Reinberg D. SirT3 is a nuclear NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev*. 2007;21(8):920-8.
- Schwer B., Bunkenborg J., Verdin R.O., Andersen J.S., Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103: 10224–29.
- Scott W., Stevens J., Binder-Macleod S.A. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther*. 2001; 81(11): 1810-6.
- Sevilla L., Gumà A., Enrique-Tarancón G., Mora S., Muñoz P., Palacín M., Testar X., Zorzano A. Chronic high-fat feeding and middle-aging reduce in an additive fashion Glut4 expression in skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;235(1):89-93.
- Shimazu T., Hirschey M.D., Hua L., Dittenhafer-Reed K.E., Schwer B., Lombard D.B., Li Y., Bunkenborg J., Alt F.W., Denu J.M., Jacobson M.P., Verdin E. SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab*. 2010;12(6):654-61.
- Shinmura K., Tamaki K., Sano M., Murata M., Yamakawa H., Ishida H., Fukuda K. Impact of long-term caloric restriction on cardiac senescence: caloric restriction ameliorates cardiac diastolic dysfunction associated with aging. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(1):117-27.
- Short K.R., Vittone J.L., Bigelow M.L., Proctor D.N., Coenen-Schimke J.M., Rys P., Nair K.S. Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training. *J. Appl. Physiol.*, 2005; 99: 95-102.
- Siedlecka K., Bogusławski W. Sirtuiny- enzymy długowieczności?. *Gerontologia Polska* 2005; 13(3): 147-152.
- Simoneau J.A., Veerkamp J.H., Turcotte L.P., Kelley D.E. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J*. 1999;13(14):2051-60.
- Slawik M., Vidal-Puig A.J. Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging. *Ageing Res Rev*. 2006;5(2):144-64.
- Soeters M.R., Sauerwein H.P., Duran M., Wanders R.J., Ackermans M.T., Fliers E., Houten S.M., Serlie M.J. Muscle acylcarnitines during short-term fasting in lean healthy men. *ClinSci (Lond)*. 2009;116(7):585-92.

- Solomon T.P., Sistrun S.N., Krishnan R.K., Del Aguila L.F., Marchetti C.M., O'Carroll S.M., O'Leary V.B., Kirwan J.P. Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *J. Appl. Physiol.*, 2008; 104: 1313-1319.
- Soukup T., Zacharová G., Smerdu V. Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem.* 2002;104(4):399-405.
- Sreekumar R., Unnikrishnan J., Fu A., Nygren J., Short K.R., Schimke J., Barazzoni R., Nair K.S. Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am J PhysiolEndocrinolMetab.* 2002; 283(1): E38-43.
- Ståhlberg D., Angelin B., Einarsson K. Age-related changes in the metabolism of cholesterol in rat liver microsomes. *Lipids.* 1991;26(5):349-52.
- Steinberg G.R., Parolin M.L., Heigenhauser G.J., Dyck D.J. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283(1):E187-92.
- Steinberg G.R., McAinch A.J., Chen M.B., O'Brien P.E., Dixon J.B., Cameron-Smith D., Kemp B.E. The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006; 91: 3592–3597.
- Sun C., Zhang F., Ge X., Yan T., Chen X., Shi X., Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* 2006; 6(4):307-19.
- Sundaresan N.R., Samant S.A., Pillai V.B., Rajamohan S.B., Gupta M.P. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol.* 2008; 20:6384-401.
- Sundaresan N.R., Gupta M., Kim G., Rajamohan S.B., Isbatan A., Gupta M.P. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest.* 2009; 119 (9):2758-71.
- Suwa M., Nakano H., Radak Z., Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle. *Metabolism.* 2008;57(7):986-98.
- Suzuki J., Shen W.J., Nelson B.D., Selwood S.P., Murphy G.M. Jr, Kanehara H., Takahashi S., Oida K., Miyamori I., Kraemer F.B. Cardiac gene expression profile and lipid accumulation in response to starvation. *Am J PhysiolEndocrinolMetab.* 2002;283(1):E94-E102.
- Swierczynski J. Leptin and age-related down-regulation of lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57 Suppl 6:85-102.
- Tanaka Y., Sasaki R., Fukui F., Waki H., Kawabata T., Okazaki M., Hasegawa K., Ando S. Acetyl-L-carnitine supplementation restores decreased tissue carnitine levels and impaired lipid metabolism in aged rats. *J Lipid Res.* 2004;45(4):729-35.
- Tanno M., Sakamoto J., Miura T., Shimamoto K., Horio Y.: Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem.* 2007;282(9):6823-32.
- Tong C., Morrison A., Mattison S., Qian S., Bryniarski M., Rankin B., Wang J., Thomas D.P., Li J. Impaired SIRT1 nucleocytoplasmic shuttling in the senescent heart during ischemic stress. *FASEB J.* 2013;27(11):4332-42.

- Toth M.J., Tchernof A. Lipid metabolism in the elderly. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54 Suppl 3:S121-5.
- Tsai A.G., Wadden T.A. The evolution of very-low-calorie diets: an update and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14 (8):1283-93.
- Tucker M.Z., Turcotte L.P. Impaired fatty acid oxidation in muscle of aging rats perfused under basal conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(5):E1102-9.
- Tucker M.Z., Turcotte L.P. Aging is associated with elevated muscle triglyceride content and increased insulin-stimulated fatty acid uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(4):E827-35.
- Unger R.H., Clark G.O., Scherer P.E., Orci L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):209-14.
- Vakhrusheva O., Smolka C., Gajawada P., Kostin S., Boettger T., Kubin T., Braun T., Bober E. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res.* 2008; 102 (6):703-10. (a)
- Vakhrusheva O., Braeuer D., Liu Z., Braun T., Bober E. Sirt7-dependent inhibition of cell growth and proliferation might be instrumental to mediate tissue integrity during aging. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59 (9):201-12. (b)
- Valle A., Sastre-Serra J., Roca P., Oliver J. Modulation of white adipose tissue proteome by aging and calorie restriction. *Aging Cell.* 2010; 9(5):882-94.
- van Aggel-Leijssen D.P., Saris W.H., Hul G.B., van Baak M.A. Short-term effects of weight loss with or without low-intensity exercise training on fat metabolism in obese men. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(3):523-31.
- van Bilsen M., van der Vusse G.J., Reneman R.S. Transcriptional regulation of metabolic processes: implications for cardiac metabolism. *Pflugers Arch.* 1998;437(1):2-14.
- van der Lee K.A., Willemsen P.H., Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G., Pelsers M.M., Glatz J.F., Van der Vusse G.J., Van Bilsen M. Fasting-induced changes in the expression of genes controlling substrate metabolism in the rat heart. *J Lipid Res.* 2001;42(11):1752-8.
- van der Meer R.W., Rijzewijk L.J., Diamant M., Hammer S., Schär M., Bax J.J., Smit J.W., Romijn J.A., de Roos A., Lamb H.J. The ageing male heart: myocardial triglyceride content as independent predictor of diastolic function. *Eur Heart J.* 2008;29(12):1516-22.
- Varady K.A., Bhutani S., Church E.C., Klempel M.C. Short-term modified alternate-day fasting: a novel dietary strategy for weight loss and cardioprotection in obese adults. *Am J Clin Nutr.* 2009; 90(5):1138-43.
- Viljanen A.P., Karmi A., Borra R., Pärkkä J.P., Lepomäki V., Parkkola R., Lautamäki R., Järvisalo M., Taittonen M., Rönnemaa T., Iozzo P., Knuuti J., Nuutila P., Raitakari O.T. Effect of caloric restriction on myocardial fatty acid uptake, left ventricular mass, and cardiac work in obese adults. *Am J Cardiol.* 2009; 103 (12):1721-6.
- Voelter-Mahlknecht S., Letzel S., Mahlknecht U. Fluorescence in situ hybridization and chromosomal organization of the human Sirtuin 7 gene. *Int J Oncol.* 2006;28(4):899-908.
- Wanagat J., Wolff M.R., Aiken J.M. Age-associated changes in function, structure and mitochondrial genetic and enzymatic abnormalities in the Fischer 344 x Brown Norway F(1) hybrid rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34 (1):17-28.

- Wang M.Y., Grayburn P., Chen S., Ravazzola M., Orci L., Unger R.H. Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(16):6139-44.
- Wang P., Liu J., Li Y., Wu S., Luo J., Yang H., Subbiah R., Chatham J., Zhelyabovska O., Yang Q. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  is an essential transcriptional regulator for mitochondrial protection and biogenesis in adult heart. *Circ Res*. 2010;106(5):911-9.
- Wang Y.X., Lee C.H., Tiep S., Yu R.T., Ham J., Kang H., Evans R.M. Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\delta$  activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. 2003;113(2):159-70.
- Wang Z.Q., Bell-Farrow A.D., Sonntag W., Cefalu W.T. Effect of age and caloric restriction on insulin receptor binding and glucose transporter levels in aging rats. *Exp Gerontol*. 1997;32(6):671-84.
- Wang Z.W., Pan W.T., Lee Y., Kakuma T., Zhou Y.T., Unger R.H. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. *FASEB J*. 2001;15(1):108-114.
- Watt A.J., Hoy A.J. Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302: E1315-1328.
- Whitman S.A., Wacker M.J., Richmond S.R., Godard M.P. Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch*. 2005; 450: 437-446.
- Wierzbicki P. Analiza mutacji i ekspresji genu SASH1 w zmianach dysplastycznych błony śluzowej w przewlekłych zapaleniach jelita grubego oraz raku jelita grubego. Rozprawa doktorska, Gdańsk 2007.
- Wrońska A. Ocena ekspresji sirtuiny 1, sirtuiny 6 i sirtuiny 7 u starych i młodych szczurów poddanych diecie restrykcyjnej oraz w cyklu głodzenia- karmienie. Rozprawa doktorska, Gdańsk 2013.
- Wronska A., Sledzinski T., Goyke E., Lawniczak A., Wierzbicki P., Kmiec Z. Short-term calorie restriction and refeeding differently affect lipogenic enzymes in major white adipose tissue depots of young and old rats. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(1):117-26.
- Xu J., Knutson M.D., Carter C.S., Leeuwenburgh C. Iron accumulation with age, oxidative stress and functional decline. *PLoS One*. 2008; 3(8): e2865.
- Yanovski S.Z., Yanovski J.A. Obesity. *N Engl J Med*. 2002;346(8):591-602.
- Yu W., Zhou H.F., Lin R.B., Fu Y.C., Wang W. Short-term calorie restriction activates SIRT1-4 and -7 in cardiomyocytes in vivo and in vitro. *Mol Med Rep*. 2014; 9(4):1218-24.
- Yuan H., Marmorstein R. Structural basis for sirtuin activity and inhibition. *J Biol Chem*. 2012; 287(51):42428-35.
- Zanquetta M.M., Nascimento M.E., Mori R.C., D'Agord Schaan B., Young M.E., Machado U.F. Participation of beta-adrenergic activity in modulation of GLUT4 expression during fasting and refeeding in rats. *Metabolism*. 2006;55(11):1538-45.

- Zhang L., Keung W., Samokhvalov V., Wang W., Lopaschuk G.D. Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *BiochimBiophysActa*. 2010 Jan;1801(1):1-22.
- Zhang Y., Guo K.Y., Diaz P.A., Heo M., Leibel R.L. Determinants of leptin gene expression in fat depots of lean mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2002; 282: R226–R234.
- Zhu M., Miura J., Lu L.X., Bernier M., DeCabo R., Lane M.A., Roth G.S., Ingram D.K. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Exp Gerontol*. 2004;39(7):1049-59.
- Zhu M., de Cabo R., Anson R.M., Ingram D.K., Lane M.A. Caloric restriction modulates insulin receptor signaling in liver and skeletal muscle of rat. *Nutrition*, 2005; 21: 378-388.
- Zhu M., Lee G.D., Ding L., Hu J., Qiu G., de Cabo R., Bernier M, Ingram D.K., Zou S. Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction. *Exp Gerontol*. 2007;42(8):733-44.

Strony www:

<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/english/gakka/seibutsu/seibutu1.html>

<https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2193>