

Marcin Wołosiewicz

Rola desaturazy stearoilo-CoA 4 w regulacji metabolizmu i funkcji mięśnia sercowego myszy

Praca doktorska wykonana w Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR: Prof. dr hab. Paweł Dobrzyń

Warszawa, 2024

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi niniejszej rozprawy doktorskiej, Profesorowi Pawłowi Dobrzyniowi, za wskazanie kierunków badań, za opiekę i towarzyszenie mi na każdym etapie mojego rozwoju naukowego.

> Prof. Agnieszce Dobrzyń za wszechstronną pomoc, życzliwość i motywację do dalszej pracy.

Wszystkim byłym i obecnym Koleżankom i Kolegom z Pracowni Molekularnej Biochemii Medycznej oraz Pracowni Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych, za miłą atmosferę w pracy i wspólne, twórcze dyskusje.

> Dr hab. n. med. Monice Dudzie, prof. CMKP z Zakładu Fizjologii Klinicznej Centrum Kształcenia Podyplomowego w Warszawie za pomoc w badaniu echokardiograficznym serc myszy.

Dr Hannie Nieznańskiej, dr Andrzejowi Szczepankiewiczowi i dr Agnieszce Kępczyńskiej z Pracowni Mikroskopii Elektronowej IBD za pomoc w przygotowaniu i obrazowaniu preparatów mikroskopowych.

Niniejszą pracę dedykuję przede wszystkim mojej Żonie oraz najbliższej Rodzinie, dziękując za nieustanne wsparcie i poświęcenie dla mojego rozwoju naukowego.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki (grant Sonata BIS 6 UMO-2016/22/E/NZ4/00650).

Wykaz stosowanych skrótów

ABHD5 – O-acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3-fosforanu (ang. *abhydrolase domain- containing protein 5*)

AC – cyklaza adenylanowa (ang. *adenylyl cyclase*)

ACAT1 – acetylo-CoA acylotransferaza/tiolaza (ang. *acetyl-CoA acetyltransferase*)

ACC – karboksylaza acetylo-CoA (ang. *acetyl-CoA carboxylase*)

ACLY – liaza cytrynianowa (ang. *ATP-citrate synthase*)

ACS – syntetaza acetylo-CoA (ang. *acetyl-CoA synthetase*)

ADP – adenozynodifosforan (ang. *adenosine diphosphate*)

AGPAT – acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3-fosforanu (ang. *1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase*)

AKT – kinaza białkowa B (ang. protein kinase B)

AMP – adenozyno-5'-monofosforan (ang. *adenosine-5'-monophosphate*)

AMPK – białkowa kinaza aktywowana przez AMP (ang. AMP-activated protein kinase)

ANP – peptyd natriuretyczny typu A (ang. *A-type natriuretic peptide*)

AS160 – substrat białkowy 160 kDa dla kinazy AKT (ang. AKT substrate of 160 kDa)

ATGL – swoista dla adipocytów lipaza triacyloglicerolowa (ang. adipose triglyceride lipase)

ATP – adenozynotrifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*)

AWTd/s – grubość przedniej ściany lewej komory serca w rozkurczu/skurczu (ang. *anterior wall thickness in diastole/systole*)

BHT – butylowany hydroksytoluen (ang. *butylated hydroxytoluene*)

BNP – peptyd natriuretyczny typu B (ang. B-type natriuretic peptide)

BSA – albumina surowicy bydlęcej (ang. bovine serum albumin)

C/EBP α/β – białko α/β wiążące wzmacniacz transkrypcji/CCAAT (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein* α/β)

CACT – translokaza karnityno-acylokarnitynowa (ang. carnitine-acylcarnitine translocase)

CAMK – kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny (ang. $Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase)$

cAMP – cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan (ang. cyclic adenosine monophosphate)

CD36 – antygen różnicowania komórkowego 36 / translokaza kwasów tłuszczowych (ang. cluster of differentiation 36 / fatty acid translocase)

CE – estry cholesterolu (ang. cholesteryl esters)

ChREBP – białko wiążące sekwencję odpowiedzi na węglowodany (ang. *carbohydrate-responsive element-binding protein*)

CO – pojemność minutowa serca (ang. cardiac output)

CoA – koenzym A (ang. *coenzyme A*)

CPT1 – acylotransferaza karnitynowa 1 (ang. *carnitine palmitoyl transferase*)

CVD – choroba układu sercowo-naczyniowego (ang. cardiovascular disease)

DAG – diacyloglicerole (ang. *diacylglycerols*)

DGAT – acylotransferaza diacyloglicerolu (ang. diacylglycerol acyltransferase)

DRP1 – białko podobne do dynaminy-1 (ang. *dynamin-1-like protein*)

ECHS1 – hydrataza enoilo-CoA (ang. enoyl-CoA hydratase)

EDD – końcoworozkurczowa średnica lewej komory (ang. end-diastolic diameter)

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)

EDV – objętość końcoworozkurczowa lewej komory serca (ang. end-diastolic volume)

EF – frakcja wyrzutowa (ang. ejection fraction)

EGTA – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy (ang. *ethylene* glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)

ELOVL – elongaza bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *very long chain fatty acid elongase*)

ENO – enolaza (ang. enolase)

ER – siateczka śródplazmatyczna (ang. endoplasmic reticulum)

ESD – końcowoskurczowa średnica lewej komory serca (ang. end-systolic diameter)

ESV – objętość końcowoskurczowa lewej komory serca (ang. end-systolic volume)

ETC – łańcuch transportu elektronów (ang. electron transport chain)

FA – kwas tłuszczowy (ang. *fatty acid*)

FABP – białko wiążące kwas tłuszczowy (ang. fatty acid binding protein)

FABP_c – cytoplazmatyczne białko wiążące kwas tłuszczowy (ang. cytoplasmic fatty acid binding protein)

FABP_{pm} – białko błony komórkowej wiążące kwasy tłuszczowe (ang. *plasma membrane fatty acid binding protein*)

FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. flavin adenine dinucleotide)

FADH₂ – zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. *reduced flavin adenine dinucleotide*)

FAS – syntaza kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid synthase)

FATP – białko transportujące kwasy tłuszczowe (ang. fatty acid-transport protein)

FFA – wolne kwasy tłuszczowe (ang. free fatty acids)

FIS1 – białko podziału mitochondriów (ang. mitochondrial fission 1 protein)

G0S2 – przełącznik molekularny faz G0/G1 cyklu komórkowego (ang. G0/G1 switch gene 2)

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GLUT1/4 – transporter glukozy typu 1/4 (ang. glucose transporter type 1/4)

GPAT1 – acylotransferaza glicero-3-fosforanu 1 (ang. glycerol-3-phosphate acyltransferase 1)

HAD – dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA (ang. 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)

HCD – dieta wysokowęglowodanową (ang. high-carbohydrate diet)

HF – niewydolność serca (ang. heart failure)

HFD - dieta wzbogacona w tłuszcze (ang. high-fat diet)

HFpEF – niewydolność serca z zachowaną frakcją wyrzutową (ang. *heart failure with preserved ejection fraction*)

HK – heksokinaza (ang. hexokinase)

HOMA-IR – współczynnik oszacowania stopnia insulinooporności (ang. *homeostatic model assessment of insulin resistance*)

HR – częstość uderzeń serca (ang. *heart rate*)

HSL – lipaza zależna od hormonów (ang. hormone-sensitive lipase)

IMM – wewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *inner mitochondrial membrane*)

KEAP1 – białko wiążące NRF2 (ang. kelch-like ECH-associated protein 1)

LAMP – białko membrany lizosomu (ang. lysosome associated membrane protein)

LC3B – lekki łańcuch 3B białek 1A/1B związanych z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated protein 1A/1B–light chain 3B*)

LD – kropla lipidowa (ang. *lipid droplet*)

LDH – dehydrogenaza mleczanowa (ang. *lactate dehydrogenase*)

LPA – kwas lizofosfatydowy (ang. lysophosphatidic acid)

LXR α – wątrobowy receptor X α (ang. *liver X receptor* α)

MAG – monoacyloglicerole (ang. monoacylglycerols)

MAM – błony związane z mitochondriami (ang. mitochondria-associated membrane)

MAPK – kinaza aktywowana mitogenami p38 (ang. mitogen-activated protein kinase p38)

MCD – dekarboksylaza malonylo-CoA (ang. *malonyl-CoA decarboxylase*)

MEF2 – miogenny czynnik wzmacniający 2 (ang. myocyte enhancer factor 2)

MFN – mitofuzyna (ang. *mitofusin*)

MI – zawał mięśnia sercowego (ang. myocardial infarction)

MPC – mitochondrialny transporter pirogronianu (ang. *mitochondrial pyruvate carrier*)

mSREBP1c – forma aktywna białka SREBP1c (białka wiążącego sterolowy element regulatorowy 1c)

MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. monounsaturated fatty acids)

NAD⁺ – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADH – zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. *reduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NRF – jądrowy czynnik oddechowy (ang. nuclear respiratory factor)

OMM – zewnętrzna błona mitochondrialna (ang. *outer mitochondrial membrane*)

OPA1 – GTPaza podobna do dynaminy (ang. dynamin-like GTPase)

PA – kwas fosfatydowy (ang. *phosphatidic acid*)

PAP – fosfataza fosfatydowa (ang. *phosphatidate phosphatase*)

PBS – buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate buffered saline)

PDH – dehydrogenaza pirogronianowa (ang. *pyruvate dehydrogenase*)

PDK – kinaza dehydrogenazy pirogronianowej (ang. pyruvate dehydrogenase kinase)

PFK – fosfofruktokinaza (ang. *phosphofructokinase*)

PGC-1 α – koaktywator receptora PPAR γ typu 1 α (ang. *peroxisome proliferator activated receptor* γ *coactivator* 1 α)

PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphoinositide 3-kinase)

PK – kinaza pirogronianowa (ang. pyruvate kinase)

PKA – kinaza białkowa A (ang. protein kinase A)

PL – fosfolipidy (ang. *phospholipids*)

PLIN – perylipina (ang. perilipin)

PLN – fosfolamban (ang. phospholamban)

 $\label{eq:pmsf} \textbf{PMSF} - fluorek\ fenylometylosulfonylu\ (ang.\ phenylmethylsulfonyl\ fluoride)$

PPAR α/γ – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α/γ (ang. *peroxisome proliferator activated receptor* α/γ)

preSREBP1c – forma nieaktywna białka SREBP1c (białka wiążącego sterolowy element regulatorowy 1c)

PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acids)

PWTd/s – grubość tylnej ściany lewej komory serca w rozkurczu/skurczu (ang. *posterior wall thickness in diastole/systole*)

qPCR – reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitive polymerase chain reaction*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

RWT – względna grubość ściany lewej komory serca (ang. relative wall thickness)

RXR – receptor retinoidu X (ang. *retinoid X receptor*)

RyR – kanał rianodynowy (ang. ryanodine receptor)

SCD – desaturaza stearoilo-CoA (ang. stearoyl-CoA desaturase)

SCD1_{AKO} – myszy pozbawione SCD1 tylko w tkance tłuszczowej (ang. *adipose-specific SCD1 knockout*)

SCD1_{GKO} – myszy pozbawione SCD1 w całym organizmie (ang. global SCD1 knockout)

SCD1_{IKO} – myszy pozbawione SCD1 tylko w jelicie (ang. *intestine-specific SCD1 knockout*)

SCD1_{LAKO} – myszy pozbawione SCD1 w wątrobie i tkance tłuszczowej (ang. *liver- and adipose-specific SCD1 knockout*)

SCD1_{LKO} – myszy pozbawione SCD1 tylko w wątrobie (ang. *liver-specific SCD1 knockout*)

SCD1sko – myszy pozbawione SCD1 tylko w skórze (ang. skin-specific SCD1 knockout)

SCD2^{-/-} – myszy pozbawione SCD2 w całym organizmie (ang. *SCD2 global knock-out mice*)

SCD4^{-/-} – myszy pozbawione SCD4 w całym organizmie (ang. *SCD4 global knock-out mice*)

SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

SERCA2 – sarkoplazmatyczna Ca²⁺-ATPaza typu 2 (ang. sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2)

SFA – nasycone kwasy tłuszczowe (ang. saturated fatty acids)

SRE – sekwencja odpowiedzi na sterole (ang. *sterol response elements*)

SREBP – białko wiążące sterolowy element regulatorowy (ang. sterol regulatory elementbinding transcription factor)

SV – objętość wyrzutowa (ang. *stroke volume*)

T2D – cukrzyca typu drugiego (ang. *type 2 diabetes*)

TAC – zabieg poprzecznego zawężenia aorty (ang. transverse aortic constriction)

TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. *transmission electron microscopy*)

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (ang. *tetramethylethylenediamine*)

TFAM – mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (ang. *mitochondrial transcription factor A*)

TG – triacyloglicerole (ang. *triacylglycerols*)

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *thin layer chromatography*)

UCP3 – białko rozprzęgające 3 (ang. *uncoupling protein 3*)

VLCAD – dehydrogenaza acylo-CoA bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase)

WT – myszy typu dzikiego (ang. *wild-type mice*)

1.	Streszczen	nie	1
2.	Abstract		3
3.	Wstęp		5
3	.1. Metab	olizm lipidów w sercu	5
	3.1.1. Tra	nsport FAs do kardiomiocytów	5
	3.1.1.1.	Mechanizm transportu FAs	5
	3.1.1.2.	Regulacja transportu FAs	6
	3.1.2. Lip	ogeneza w sercu	7
	3.1.2.1.	Synteza FAs de novo	8
	3.1.2.2.	Synteza TG	9
	3.1.2.3.	Regulacja lipogenezy	. 10
	3.1.3. Syn	nteza kropli lipidowych	. 11
	3.1.4. Lip	oliza w sercu	.12
	3.1.4.1.	Mechanizm lipolizy	.12
	3.1.4.2.	Regulacja lipolizy	.13
	3.1.5. Ro	a SCD w metabolizmie	.14
	3.1.5.1.	SCD1	.15
	3.1.5.2.	SCD2 i SCD3	. 20
	3.1.5.3.	Funkcje sercowo-specyficznej SCD4	20
	3.1.5.4.	Regulacja desaturacji FAs	. 22
	3.1.5.5.	Rola SCD1 w sercu	.23
	3.1.6. Utl	enianie kwasów tłuszczowych	. 24
	3.1.6.1.	Mechanizm utleniania FAs	. 24
	3.1.6.2.	Regulacja utleniania FAs	.24
3	.2. Metab	olizm glukozy w sercu	.26
	3.2.1. Tra	nsport glukozy do kardiomiocytów	. 27
	3.2.2. Utl	enianie glukozy w sercu	.27
3	.3. Rola r	nitochondriów w sercu	.28
	3.3.1. Łań	ncuch transportu elektronów i fosforylacja oksydacyjna	. 29
	3.3.2. Ko	ntrola jakości mitochondriów, mitofagia	.31
3	.4. Wpływ	v jonów Ca ²⁺ na funkcje i metabolizm serca	.33
3	.5. Przebu	udowa i dysfunkcja serca towarzyszące otyłości	.34

4.	Założenia i cele pracy	37
5.	Materiały i metody	38
4	5.1. Modele <i>in vivo</i>	38
	5.1.1. Badanie echokardiograficzne	38
	5.1.2. Dootrzewnowy test tolerancji glukozy	39
	5.1.3. Pomiar długości kości piszczelowej	39
	5.1.4. Pobranie krwi	40
	5.1.5. Pobranie ściany lewej komory serca	40
	5.1.6. Analiza składników osocza	40
	5.1.7. Obliczenie współczynnika insulinooporności (HOMA-IR)	41
4	5.2. Modele <i>in vitro</i>	41
	5.2.1. Hodowla komórek HL-1	41
	5.2.2. Wyciszenie ekspresji genu Scd4 w komórkach HL-1	41
	5.2.3. Nadekspresja genu Scd4 w komórkach HL-1	42
	5.2.4. Traktowanie komórek HL-1 kwasem stearynowym	42
	5.2.5. Analiza przeżywalności komórek	43
	5.2.6. Ocena przeżywalności komórek HL-1 traktowanych kwasem stearynowym	43
4	5.3. Konstrukcja wektora pSCD4	44
	5.3.1. Uzyskanie insertu i wektora do klonowania	44
	5.3.2. Ligacja	44
	5.3.3. Przygotowanie podłoża do hodowli bakterii	45
	5.3.4. Transformacja bakterii	45
	5.3.5. Izolacja plazmidu	45
4	5.4. Analiza zawartości białek metodą Western Blot	45
	5.4.1. Homogenizacja ściany lewej komory serca	45
	5.4.2. Liza komórek HL-1	45
	5.4.3. Pomiar stężenia białka	46
	5.4.4. Elektroforetyczny rozdział białek w warunkach denaturujących (SDS/PAGE)	46
	5.4.5. Transfer elektroforetyczny oraz detekcja białek	46
4	5.5. Analiza zawartości lipidów	48
	5.5.1. Ekstrakcja lipidów	48
	5.5.2. Rozdział lipidów obojętnych z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowe	ej 49
	5.5.3. Analiza kwasów tłuszczowych z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężo ze spektrometrią mas (GC-MS)	onej 49

5.6. Analiza poziomu mRNA	51
5.6.1. Izolacja RNA i synteza cDNA	51
5.6.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)	52
5.6.3. Analiza poziomu mRNA metodą bezpośredniej detekcji ekspresji genów	52
5.7. Barwienie lipidów obojętnych w komórkach HL-1 i ekstrakcja barwnika	53
5.8. Pomiar aktywności ATGL	54
5.9. Barwienia histochemiczne	54
5.9.1. Pobranie serca i przygotowanie skrawków parafinowych	54
5.9.2. Odparafinowanie i uwodnienie skrawków	55
5.9.3. Barwienie z zastosowaniem hematoksyliny i eozyny (H&E)	55
5.9.4. Barwienie z zastosowaniem czerwieni Syriusza	55
5.9.5. Odwodnienie skrawków	55
5.9.6. Przygotowanie skrawków mrożeniowych	55
5.9.7. Barwienie ROS	55
5.9.8. Barwienie zależne od aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy NADH	56
5.10. Barwienie immunofluorescencyjne skrawków parafinowych serc	56
5.11. Mikroskopia elektronowa	56
5.12. Analiza statystyczna	57
5.13. Lista odczynników	57
6. Wyniki	60
6.1. Wpływ wyciszenia ekspresji Scd4 na strukturę i funkcję serca	60
6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4 ^{-/-}	60
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 	60 60
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 	60 60 61
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 	60 60 61 62
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 6.1.1.4. Zawartość lipidów w sercu 	60 60 61 62 62
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 6.1.1.4. Zawartość lipidów w sercu 6.1.2. Struktura i funkcjonowanie serca 	60 60 61 62 62 69
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 6.1.1.4. Zawartość lipidów w sercu 6.1.2. Struktura i funkcjonowanie serca 6.1.2.1. Analiza echokardiograficzna 	60 60 61 62 62 69 69
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 6.1.1.4. Zawartość lipidów w sercu 6.1.2. Struktura i funkcjonowanie serca 6.1.2.1. Analiza echokardiograficzna 6.1.2.2. Zwłóknienie mięśnia sercowego, rozmiar kardiomiocytów i stru sarkomerów 	60 60 61 62 62 69 69 ktura 69
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 6.1.1.4. Zawartość lipidów w sercu 6.1.2. Struktura i funkcjonowanie serca 6.1.2.1. Analiza echokardiograficzna 6.1.2.2. Zwłóknienie mięśnia sercowego, rozmiar kardiomiocytów i stru sarkomerów 6.1.3. Zawartość lipidów w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją <i>Scd4</i> 	60 60 61 62 62 69 69 ktura 69 72
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 6.1.4. Zawartość lipidów w sercu 6.1.2.1. Analiza echokardiograficzna 6.1.2.2. Zwłóknienie mięśnia sercowego, rozmiar kardiomiocytów i stru sarkomerów 6.1.3. Zawartość lipidów w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją <i>Scd4</i> 6.1.4. Zawartość lipidów w komórkach HL-1 z nadekspresją <i>Scd4</i> 	60 60 61 62 62 69 69 72 73
 6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-} 6.1.1.1. Masa zwierząt 6.1.1.2. Składniki osocza 6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności 6.1.1.4. Zawartość lipidów w sercu 6.1.2.1. Analiza echokardiograficzna 6.1.2.2. Zwłóknienie mięśnia sercowego, rozmiar kardiomiocytów i stru sarkomerów 6.1.3. Zawartość lipidów w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją <i>Scd4</i> 6.2. Wpływ wyciszenia <i>Scd4</i> na szlaki metabolizmu lipidów w sercu 	60 61 62 62 69 69 72 72 73 75

	6.2.2. Proces lipogenezy w sercu myszy SCD4 ^{-/-}	. 77
	6.2.3. Proces lipolizy w sercu myszy SCD4 ^{-/-}	. 79
	6.2.4. Proces lipolizy w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją Scd4	. 81
	6.2.5. Proces β-oksydacji kwasów tłuszczowych w sercu myszy SCD4 ^{-/-}	. 83
	6.2.6. Transport kwasów tłuszczowych do kardiomiocytów	. 84
6.	3. Wpływ wyciszenia <i>Scd4</i> na szlak metabolizmu glukozy	. 86
6.	4. Wpływ wyciszenia Scd4 na aktywność mitochondriów i poziom ROS w sercu	. 88
	6.4.1. Liczba mitochondriów	. 88
	6.4.2. Szlak selektywnej degradacji mitochondriów (mitofagia)	. 89
	6.4.3. Łańcuch transportu elektronów (fosforylacja oksydacyjna)	.91
	6.4.4. Poziom ROS	. 93
6.	5. Łańcuch transportu elektronów w komórkach HL-1 z wyciszoną ekspresją Scd4	.93
6.	6. Wpływ wyciszenia Scd4 na gospodarkę jonów wapnia w kardiomiocytach	. 94
	6.6.1. Zawartość białek regulujących równowagę wapniową w sercu myszy	. 94
1	6.6.2. Zawartość białek regulujących równowagę wapniową i wewnątrzkomórko poziom jonów wapnia w komórkach HL-1	wy .96
7.	Dyskusja	. 97
8.	Podsumowanie i wnioski	107
9.	Piśmiennictwo	108

1. Streszczenie

Nagromadzenie szkodliwych metabolitów lipidowych w kardiomiocytach prowadzi do rozwoju lipotoksyczności, co wiąże się z aktywacją lub zahamowaniem szlaków sygnałowych, powodując stres i dysfunkcję organelli, deficyt energetyczny i apoptozę. Kolejnym efektem lipotoksyczności jest spadek wrażliwości serca na insulinę, co przesuwa metabolizm serca w kierunku większego wychwytu, magazynowania i utleniania kwasów tłuszczowych (FAs). Wysokie tempo utleniania FAs zwiększa ilość produkowanych reaktywnych form tlenu (ROS) powodując stres oksydacyjny, uszkodzenie mitochondriów i zaburzenie homeostazy jonów Ca²⁺.

Desaturaza stearoilo-CoA (SCD) jest enzymem, który nie tylko katalizuje syntezę jednonienasyconych kwasów tłuszczowych, ale także reguluje procesy lipolizy oraz β-oksydacji, przez co modyfikuje parametry funkcjonalne mięśnia sercowego. U myszy zidentyfikowano cztery izoformy SCD, z których SCD4 jest uważana za izoformę specyficzną dla serca. Wykazano, że wyciszenie *Scd4* w sercu myszy zmniejszyło aktywację białkowej kinazy aktywowanej przez AMP, która była indukowana przez zawał serca (MI). Brak ekspresji *Scd4* w mięśniu sercowym po MI zmniejszał także powstawanie ROS oraz obniżał poziom czynników proangiogennych w sercu i osoczu, co sugeruje, że SCD4 pozytywnie reguluje tworzenie naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym myszy po MI. Rola SCD4 w regulacji metabolizmu i funkcji serca jest jednak słabo poznana.

Głównym celem pracy doktorskiej było określenie wpływu wyciszenia ekspresji *Scd4* na strukturę, funkcję i metabolizm serca w stanie fizjologicznym oraz w otyłości. W tym celu: 1) określono rolę SCD4 w regulacji ogólnoustrojowego metabolizmu myszy; 2) zbadano wpływ wyciszenia *Scd4* na funkcję i strukturę serca; 3) zidentyfikowano szlaki metaboliczne, przez które SCD4 reguluje metabolizm lipidów w sercu; 4) określono wpływ ekspresji *Scd4* na strukturę i aktywność mitochondriów w kardiomiocytach. W badaniach wykorzystano myszy typu dzikiego oraz myszy z wyciszoną ekspresją *Scd4* (SCD4^{-/-}) karmione dietą standardową lub wzbogaconą w tłuszcze (HFD) przez 8 tygodni w celu wywołania otyłości. Eksperymenty przeprowadzono również na modelu *in vitro* z wykorzystaniem mysich kardiomiocytów HL-1 z wyciszoną ekspresją *Scd4*.

Przeprowadzone badania wykazały, że brak SCD4 u myszy wywiera skutki ogólnoustrojowe, tj. zmniejsza stłuszczenie ciała, hiperinsulinemię i hipercholesterolemię oraz zwiększa wrażliwość na insulinę, u myszy karmionych HFD, pomimo, że dotychczas opisano występowania SCD4 jedynie w sercu. Brak SCD4 w warunkach fizjologicznych wywołał niewielkie zmiany w morfologii serca, natomiast zapobiegł koncentrycznej przebudowie serca w warunkach HFD. Wyciszenie ekspresji *Scd4* obniżyło poziom lipidów zmagazynowanych w kardiomiocytach, nie wpłynęło natomiast na ekspresję pozostałych izoform *Scd* w sercu. Niższy poziom lipidów w kardiomiocytach myszy SCD4^{-/-} był związany z aktywacją swoistej dla adipocytów lipazy triacyloglicerolowej, a przez to lipolizy. Jednoczesna aktywacja lipogenezy, β-oksydacji i lipolizy sugeruje zwiększoną dynamikę kropli lipidowych (LDs), przy czym wyciszenie ekspresji *Scd4* zmniejszyło indukowany przez HFD wzrost LDs w kardiomiocytach. Wyniki te wskazują, że SCD4 jest zaangażowane w regulację metabolizmu energetycznego serca. Wykazano także zahamowanie przerostu mitochondriów i nadprodukcji ROS w kardiomiocytach z wyciszoną ekspresją *Scd4* w warunkach przeciążenia lipidami.

Streszczenie

Było to związane ze wzmożeniem procesu mitofagii i spadkiem aktywności dehydrogenazy NADH. Stwierdzono także, że SCD4 bierze udział w regulacji homeostazy Ca²⁺ w sercu w warunkach HFD, poprzez wzrost zawartości białek fosfolambanu i sarkoplazmatycznej Ca²⁺-ATPazy typu 2.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że SCD4 reguluje nie tylko metabolizm lipidów w sercu, ale wpływa także na funkcję mięśnia sercowego oraz metabolizm całego organizmu, szczególnie w modelu HFD.

2. Abstract

Accumulation of toxic lipid metabolites in cardiomyocytes leads to lipotoxicity, which is associated with activation or inhibition of signaling pathways, causing stress and dysfunction of organelles, energy deficit and apoptosis. Lipotoxicity also decreases cardiac insulin sensitivity, causing a shift in cardiac metabolism toward increased fatty acid (FA) uptake, storage and oxidation. The high rate of FA oxidation increases the production of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress, mitochondrial damage and disruption of Ca²⁺ homeostasis.

Stearoyl-CoA desaturase (SCD) is a key enzyme involved in the regulation of lipid metabolism in cardiomyocytes. In addition to the formation of monounsaturated fatty acids, this enzyme regulates lipolysis and β -oxidation, thereby affecting functional parameters of the heart. Four isoforms of SCD have been identified in mice, of which SCD4 is considered the cardiac-specific isoform. The loss of SCD4 in the mouse heart has been shown to reduce AMP-activated protein kinase activation induced by myocardial infarction (MI). Lack of *Scd4* expression in the heart after MI also reduced ROS formation by decreasing protein levels of the NADPH oxidase subunit. Loss of SCD4 also decreased proangiogenic factors in the heart and plasma, suggesting that SCD4 positively regulates blood vessel formation in the mouse heart after MI. However, the role of SCD4 in regulating cardiac metabolism and function remains poorly understood.

The main objective of this dissertation was to determine the effects of SCD4 deficiency on cardiac structure, function and metabolism under physiological conditions and in obesity. To test this: 1) the role of SCD4 in the regulation of systemic metabolism in mice was determined; 2) the effects of SCD4 deficiency on cardiac function and structure were investigated; 3) the metabolic pathways through which SCD4 regulates lipid metabolism in the heart were identified; 4) the effects of *Scd4* expression on mitochondrial structure and activity in cardiomyocytes were determined. The study was conducted on wild-type (WT) mice and SCD4-deficient (SCD4^{-/-}) mice kept under normal conditions or fed a high-fat diet (HFD) for 8 weeks to induce obesity. *In vitro* studies were performed using a mouse HL-1 cardiomyocytes with silenced *Scd4* expression.

The study showed that loss of SCD4 had systemic effects, reducing body adiposity, hyperinsulinemia and hypercholesterolemia, and increasing insulin sensitivity in HFD-fed mice, despite SCD4 being a cardiac-specific isoform. The absence of SCD4 under normal conditions caused minor changes in heart morphology, reducing left ventricular end-diastolic diameter and volume, but prevented concentric cardiac remodeling under HFD conditions. *Scd4* deficiency reduced lipid accumulation in cardiomyocytes, but did not affect the expression of other *Scd* isoforms in the heart. Lower lipid levels in SCD4-deficient cardiomyocytes were associated with activation of adipose triglyceride lipase and lipolysis. Simultaneous activation of lipogenesis, β -oxidation and lipolysis indicated increased lipid droplet (LD) dynamics, and downregulation of SCD4 inhibited the HFD-induced increase in LDs growth in cardiomyocytes. These results indicate that SCD4 is involved in the regulation of cardiac energy metabolism. Mitochondrial hypertrophy and ROS overproduction caused by lipid accumulation and toxicity were inhibited in cardiomyocytes with silenced *Scd4* expression under lipid overload conditions. This was associated with increased mitophagy and decreased NADH

Abstract

dehydrogenase activity. SCD4 was also found to be involved in the regulation of Ca^{2+} homeostasis in the heart under HFD conditions, through increased levels of phospholamban and sarcoplasmic Ca^{2+} -ATPase type 2.

In conclusion, the results of this study showed that SCD4 not only regulates lipid metabolism in the heart, but also affects myocardial function and systemic metabolism, especially in the HFD condition.

3. Wstęp

3.1. Metabolizm lipidów w sercu

Serce dorosłych ludzi i myszy charakteryzuje się zdolnością do metabolizowania wielu substratów energetycznych w zależności od ich dostępności, obciążenia przez wysiłek lub obecności czynników stresowych, w tym otyłości lub cukrzycy typu drugiego (ang. *type 2 diabetes*, T2D) (Lopaschuk i in. 2010, Lopaschuk i in. 2021). Głównym źródłem energii dla kardiomiocytów jest utlenianie kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acids*, FAs), które dostarcza do 70 % zapotrzebowania na adenozyno-5'-trifosforan (ang. *adenosine-5'-triphosphate*, ATP), na drugim miejscu jest utlenianie glukozy, a dalej kolejno mleczan, aminokwasy i ciała ketonowe (Lopaschuk i in. 2021).

3.1.1. Transport FAs do kardiomiocytów

3.1.1.1. Mechanizm transportu FAs

W związku z wykorzystaniem przez serce FAs jako głównego substratu energetycznego, transport tych cząsteczek do wnętrza kardiomiocytów odgrywa kluczową rolę w bilansie energetycznym. Najprostszym, ale zarazem najmniej efektywnym sposobem dostarczenia FAs do wnętrza komórki jest ich pasywny transfer przez błonę komórkową (Ryc. 1) (Glatz i in. 2010). Dlatego też, większość FAs jest transportowana do komórki przy udziale różnych białek wspomagających dyfuzję FAs przez błonę komórkową, która zachodzi w trzech etapach: (i) adsorpcja – związanie FA przez białko błony komórkowej na powierzchni komórki; (ii) translokacja – przejście polarnej grupy karboksylowej FA z zewnętrznej na wewnętrzną warstwę fosfolipidową błony; (iii) desorpcja - etap decydujący o tempie (ang. ratelimiting step) transportu, uwolnienie FA do cytoplazmy i związanie z białkiem wiążącym FA (ang. fatty acid binding protein, FABP) (Glatz i Luiken 2018, Cheng i in. 2019). Białkiem przyczyniajacym sie w najwiekszym stopniu do transportu FAs jest antygen różnicowania komórkowego 36 (ang. cluster of differentiation 36, CD36) (Ryc. 1) zwany również translokazą kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid translocase, FAT). CD36 wiaże grupę acylową na powierzchni komórki i umożliwia transport FA przez błone komórkowa na zasadzie wspomaganej dyfuzji (Glatz i in. 2016). Usunięcie genu Cd36 w sercu myszy spowodowało spadek transportu FAs do kardiomiocytów, co wiązało się ze spadkiem utleniania FAs wraz z jednoczesnym wzrostem utleniania glukozy, co pozwoliło na zachowanie ilości produkowanego ATP i miało pozytywny wpływ na funkcje serca po zawale niedokrwiennym (ang. myocardial infarction, MI) (Nagendran i in. 2013). Z drugiej strony nadekspresja Cd36 miała odwrotny efekt, tj. spowodowała zwiększenie transportu i utleniania FAs, co również wspierało funkcje serca, m.in. poprzez zmniejszenie fragmentacji mitochondriów (Guo i in. 2018). Czynnikiem łączącym wspomniane dwa skrajne warunki jest poprawa funkcji mitochondriów i sprzężenie glikolizy z utlenianiem glukozy, co wpływało na poprawę funkcji serca w związku z zapewnieniem odpowiedniej ilości ATP (Neubauer 2007, Shao i in. 2020).

Drugim białkiem zaangażowanym w transport FAs jest FATP (ang. *fatty acid-transport protein*), które transportuje głównie długołańcuchowe FAs (Ryc. 1) (Glatz i in. 2010). Nadekspresja *Slc27a1*, genu kodującego FATP1, w sercu wywołała czterokrotny wzrost transportu FAs, powodując wzrost akumulacji lipidów i dysfunkcję serca (Chiu i in. 2005).

Także FABP błony komórkowej (ang. *plasma membrane fatty acid binding protein*, FABP_{pm}) zwiększając lokalnie stężenie FAs na powierzchni błony komórkowej przyczynia się do transportu FAs we współpracy z CD36, FATP lub niezależnie od nich poprzez pasywną dyfuzję (Glatz i in. 2010, Holloway i in. 2022). Po dostarczeniu do wnętrza kardiomiocytów, FAs są w większości wiązane z cytoplazmatycznymi FABP (FABP_c), a tylko 0,1 ‰ występuje w postaci niezwiązanej (Glatz i in. 2016). Syntetaza acylo-CoA (ang. *acyl-CoA synthetase*, ACS) przyłącza do FAs grupę koenzymu A (ang. *coenzyme A*, CoA) powodując ich aktywację do kolejnych procesów takich jak estryfikacja czy utlenianie (Lopaschuk i in. 2010).



Ryc. 1. Mechanizm transportu FAs do wnętrza komórki i jego regulacja. CD36, antygen różnicowania komórkowego 36; FATP1, białko transportujące kwasy tłuszczowe; FA, kwas tłuszczowy; FABP_{pm}, białko błony komórkowej wiążące kwasy tłuszczowe; FABP_c, białko cytozolowe wiążące kwasy tłuszczowe; ACS, syntetaza acylo-CoA; PPARα, receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α; PGC-1α, koaktywator receptora PPARγ typu 1 α; C/EBPα, białko α wiążące wzmacniacz transkrypcji/CCAAT (zaadaptowano z Glatz i in. 2010).

3.1.1.2. Regulacja transportu FAs

Regulacja procesu transportu FAs do wnetrza komórki odbywa się na kilku poziomach (Ryc. 1). Pierwszym z nich jest transkrypcja genów, która znajduję się pod kontrolą, m.in.: (i) receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów α (ang. peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α), (ii) koaktywatora receptora PPAR γ typu 1 α (ang. peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-a, PGC-1a), (iii) białka a wiążącego wzmacniacz transkrypcji/CCAAT (ang. CCAAT/enhancer-binding protein α , C/EBPa) (Glatz i in. 2010). Ligandem PPARa są przede wszystkim FAs oraz ich metabolity np. estry acylo-CoA i eikozanoidy, które aktywują wspomniany czynnik transkrypcyjny do tworzenia złożonego kompleksu białkowego, m.in. heterodimeru z receptorem retinoidu X (ang. retinoid X receptor, RXR) i przyłączenia utworzonego kompleksu do sekwencji PPRE (ang. peroxisome proliferator response elements) w sekwencji promotorów docelowych genów (Georgiadi i Kersten 2012). Traktowanie komórek z nadekspresją Slc27a1 agonistami PPARa podwyższało kilkukrotnie aktywność FATP1 (Frohnert i in. 1999). Kolejno czynnikami aktywującymi PGC-1 α są m.in. oś Ca²⁺-kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny (ang. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, CaMK) typu IV-kalcyneuryna A-białko wiążące element odpowiadający na cAMP (ang. cAMP response element-binding protein, CREB), a także kinaza białkowa aktywowana przez adenozyno-5'-monofosforan (ang. adenosine-5'monophosphate, AMP; ang. AMP-activated protein kinase, AMPK), kinaza aktywowana mitogenami p38 (ang. mitogen-activated protein kinase p38, MAPK) i miogenny czynnik wzmacniający 2 (ang. *myocyte enhancer factor 2*, MEF2), które powodują wyższą ekspresję *Ppargc1a*, genu kodującego PGC-1α w odpowiedzi na niską temperaturę, głód czy wysiłek fizyczny (Qian i in. 2024). Usunięcie PGC-1α obniżyło ekspresję genów oksydacji fosforylacyjnej, prowadząc do spadku produkcji ATP i rozwoju dysfunkcji serca (Arany i in. 2005). Ekspresja C/EBPα jest regulowana przez C/EBPβ, a także przez potranslacyjne modyfikacje, jak np. fosforylacja przez MAPK, sumoilacja i acetylacja (Mota de Sá i in. 2017).

Kolejnym poziomem regulacji transportu FAs w przypadku CD36 jest translokacja z wnętrza komórki na powierzchnię błony komórkowej, w sposób analogiczny do transportera glukozy typu 4 (ang. *glucose transporter type 4*, GLUT4) (Glatz i in. 2016). Około połowa całkowitej puli CD36 znajduje się w błonie komórkowej utrzymując podstawowy poziom transportu FAs, podczas gdy pozostała część w odpowiedzi na czynniki stymulujące, jak np. insulina lub kurczenie komórek mięśniowych, jest transportowana w pęcherzykach z wnętrza komórki na powierzchnię błony, co skutkuje nawet dwukrotnym zwiększeniem transportu FAs (Ryc. 1) (Luiken i in. 2003, Glatz i in. 2018, Luiken i in. 2020). Modyfikacje potranslacyjne, jak np. przyłączenie N-acetyloglukozaminy (O-GlcNAcylacja), również zwiększają translokację CD36 (Laczy i in. 2011).

Trzecim, najmniej poznanym sposobem regulacji transportu FAs jest degradacja białek zaangażowanych w ten proces. FATP1 i CD36 związany z błoną komórkową, ale nie cytoplazmatyczny CD36, mogą być ubikwitynowane i ulegać degradacji w proteasomach, co obniża transport FAs do wnętrza komórki (Zhang i in. 2020, You i in. 2023). Innym sposobem, niezależnie od poziomu białka i translokacji CD36, jest inhibicja transportu FAs przez jony wapnia (Ca²⁺), prawdopodobnie poprzez wpływ na tempo desorpcji FA, jednak mechanizm ten nie jest w pełni poznany (Eyre i in. 2008, Angin i in. 2012, Georgiou i in. 2015).

3.1.2. Lipogeneza w sercu

Serce, jako organ wysoce wyspecjalizowany w ciągłej pracy, nie jest przystosowane do magazynowania energii, np. w formie lipidów (Christoffersen i in. 2003, Nakamura i Sadoshima 2020, Lu i in. 2021, Xu i in. 2022), mimo to charakteryzuje się wysoką ekspresją genów lipogenezy (Bednarski i in. 2016a, Bednarski i in. 2016b). W szlaku lipogenezy można wyróżnić dwa procesy – syntezę FAs *de novo* oraz syntezę triacylogliceroli (ang. *triacylglycerols*, TG) (Ryc. 2). W tkankach takich jak wątroba lub tkanka tłuszczowa, pierwszy etap lipogenezy zachodzi głównie w cytozolu, natomiast w tkankach o wysokim tempie utleniania FAs, jak np. mięśnie i serce, przebiega również w mitochondriach, pełniąc funkcję regulacyjną w utlenianiu FAs (Abu-Elheiga i in. 2005, Wedan i in. 2024). Drugi etap lipogenezy rozpoczyna się w siateczce śródplazmatycznej (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) i jest kontynuowany w odłączonej od ER kropli lipidowej (ang. *lipid droplet*, LD) (Olzmann i Carvalho 2019).



Ryc. 2. Proces lipogenezy (synteza FAs *de novo* **i TG) oraz synteza kropli lipidowej.** 16:0, kwas palmitynowy; 16:1, kwas palmitooleinowy; 18:0, kwas stearynowy; 18:1, kwas oleinowy; ACC, karboksylaza acetylo-CoA; ACLY, liaza cytrynianowa; AGPAT, acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3-fosforanu; DGAT, acylotransferaza diacyloglicerolowa; ELOVL, elongaza bardzo długołańcuchowych FAs; FAS, syntaza FAs; GPAT, acylotransferaza glicerolo-3-fosforanu; PAP, fosfataza fosfatydowa; PLIN, perylipina; SCD, desaturaza stearoilo-CoA; SOAT, acylotransferaza steroli.

3.1.2.1. Synteza FAs de novo

Głównym substratem do syntezy FAs jest acetylo-CoA, transportowany z mitochondrium do cytozolu w postaci cytrynianu – pośredniego produktu cyklu Krebsa (Ryc. 2). Innymi substratami mogą być aminokwasy, kwas octowy i etanol (Wallace i Metallo 2020, Siler i in. 1999). Po konwersji kwasu cytrynowego przez liazę cytrynianową (ang. ATPcitrate synthase, ACLY), powstały acetylo-CoA jest przekształcany przez karboksylaze acetylo-CoA (ang. acetyl-CoA carboxylase, ACC) do malonylo-CoA, bedacego substratem dla syntazy kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid synthase, FAS) (Ryc. 2). Brak ACC2 wyłącznie w sercu, wiązał się z niższym poziomem zmagazynowanych TG, wyższym tempem utleniania FAs, spadkiem zwłóknienia i zachowaniem funkcji serca, a także poprawą kontroli jakości mitochondriów (Kolwicz i in. 2012, Liu Z i in. 2020, Shao i in. 2020). Badania wykazały również kluczowe znaczenie FAS w mysim modelu pozbawionym tego enzymu w sercu. Myszy w warunkach obciążenia serca przez wysokie ciśnienie krwi (zabieg poprzecznego zawężenia aorty, ang. transverse aortic constriction, TAC) umierały w wyniku arytmii wywołanej zaburzeniem homeostazy Ca^{2+} , co nie mogło być zrekompensowane dostarczeniem egzogennego kwasu palmitynowego (16:0) (Razani i in. 2011). FAS syntezuje FAs do 16 atomów wegla, tworzac 16:0 z czasteczek malonylo-CoA i acetylo-CoA w obecności dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego zredukowanego fosforanu (ang. reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) (Wallace i Metallo 2020). W zwiazku z powyższym, do utworzenia FAs o dłuższych łańcuchach weglowych wymagana jest obecność specjalnych enzymów – elongaz bardzo długołańcuchowych FAs (ang. very long chain fatty acid elongase, ELOVL). ELOVLs znajdują się głównie w ER i działają w sposób podobny do FAS – przyłączają po dwa atomy węgla, w wyniku czego powstaje FA dłuższy o parzystą liczbę atomów węgla, np. kwas stearynowy (18:0) z 16:0 (Nie i in. 2021) (Ryc. 2).

Przedstawiony mechanizm syntezy FAs ogranicza się do nasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *saturated fatty acids*, SFA), ponieważ tylko takie może syntetyzować FAS. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) posiadające jedno wiązanie podwójne pomiędzy atomami węgla, są produktem reakcji desaturacji, katalizowanej przez enzym desaturazę stearoilo-CoA (ang. *stearoyl-CoA desaturase*, SCD) (Ryc. 2). W wyniku tej reakcji powstają m.in. kwas palmitooleinowy (16:1) i oleinowy (18:1),

będące substratami kolejnych etapów lipogenezy – syntezy TG i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (Ntambi i Miyazaki 2004). Enzymowi SCD został poświęcony osobny rozdział niniejszej rozprawy. Kolejne enzymy związane z błoną ER to desaturazy kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid desaturases*, FADS), głównie FADS1 i FADS2, które poprzez wprowadzenie kolejnych wiązań podwójnych w łańcuchu węglowym MUFA syntezują PUFA, które są ważnymi składnikami błon komórkowych, ligandami czynników transkrypcyjnych oraz substratami dla reakcji utleniania (Tosi i in. 2014).

3.1.2.2. Synteza TG

TG składają się z trzech cząsteczek FAs połączonych wiązaniem estrowym z jedną cząsteczką glicerolu. Większa część procesu syntezy TG przebiega w błonie ER, z mniejszym udziałem w mitochondriach. Pierwszy przyłączany przez acylotransferazę glicerolo-3fosforanu (ang. glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) jest SFA, czego produktem jest kwas lizofosfatydowy (ang. lysophosphatidic acid, LPA) nazywany monoacyloglicerolem (ang. monoacylglycerol, MAG) (Ryc. 2) (Coleman i Lee 2004, Lewin i in. 2008). W sercu GPAT występuje w mitochondriach (GPAT1, GPAT2) oraz w ER (GPAT3, GPAT4) (Coleman i Lee 2004, Cao i in. 2006, Shan i in. 2010), przy czym sam GPAT1 odpowiada za 30 % całkowitej aktywności tego enzymu w sercu (Lewin i in. 2008). Brak ekspresji genu GPAT1 powoduje spadek poziomu zmagazynowanych TG w sercu myszy karmionych paszą wzbogaconą w tłuszcze (ang. high-fat diet, HFD) lub wysokoweglowodanową (ang. highcarbohydrate diet, HCD) (Lewin i in. 2008). Następnie w wyniku kolejnej estryfikacji przez acylotransferazę 1-acyloglicerolo-3-fosforanu 1-acyl-glycerol-3-phosphate (ang. acyltransferase, AGPAT), z utworzeniem kwasu fosfatydowego (ang. phosphatidic acid, PA) i następującej po niej defosforylacji przez fosfatazę fosfatydową (ang. phosphatidate phosphatase, PAP) powstaje diacyloglicerol (ang. diacylglycerol, DAG). Ostatni FA będacy najczęściej endogennym MUFA, jest przyłączany przez acylotransferazę diacyloglicerolową (ang. diacylglycerol acyltransferase, DGAT) (Ryc. 2) (Man i in. 2006, Roe i in. 2018). Pozbawienie myszy DGAT2 powoduje ich śmierć zaraz po narodzinach w wyniku zaburzonej bariery lipidowej skóry i spadku poziomu substratów energetycznych, co nie może zostać skompensowane przez DGAT1 (Stone i in. 2004). Natomiast myszy z zahamowaną ekspresją Dgat1 charakteryzują się poważną dysfunkcją serca wywołaną akumulacją DAG i ceramidów oraz zwiększoną ekspresją Cd36 (Liu i in. 2014). Z drugiej strony nadekspresja Dgat1, pomimo zwiększonej akumulacji TG, nie spowodowała zaburzeń funkcji serca, zwiększyła natomiast lipolize i utlenianie FAs (Liu i in. 2009). Co ciekawe, wraz ze starzeniem się myszy nadekspresja Dgatl powodowała negatywne efekty, m.in. rozstrzeń serca z dysfunkcją rozkurczowa i zaburzenie biogenezy mitochondriów (Glenn i in. 2011).

TG syntetyzowane w ER mogą być w niewielkim stopniu magazynowane w tym organellum, a dokładniej w przestrzeni międzybłonowej, jednak wraz z nagromadzeniem się większej ilości TG dochodzi do utworzenia LD, co opisano w kolejnym rozdziale niniejszej pracy. Z kolei powstające na zewnętrznej błonie mitochondriów LPA, PA oraz DAG mogą być wykorzystane przez enzymy ER do utworzenia TG lub jako cząsteczki sygnałowe (Olzmann i Carvalho, 2019).

3.1.2.3. Regulacja lipogenezy

Lipogeneza z uwagi na jej przebieg w różnych rejonach komórki oraz wykorzystanie różnych substratów (acetylo-CoA, aminokwasy, kwas octowy, etanol) jest procesem regulowanym w bardzo złożony sposób, w zależności od dostępności substratów energetycznych – hamowana w warunkach głodzenia, aktywowana w warunkach nadpodaży np. glukozy (Siler i in. 1999, Wallace i Metallo 2020). Mechanizmami szybkiej odpowiedzi są regulacja allosteryczna i modyfikacje potranslacyjne, natomiast w dłuższej perspektywie ważną rolę odgrywa regulacja transkrypcji (Wang Y i in. 2015).

Najważniejszym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym syntezę lipidów jest białko wiażące element regulatorowy steroli (ang. sterol regulatory element binding protein, SREBP). Występuje ono w trzech izoformach SREBP2, SREBP1a i SREBP1c, przy czym ostatnia z nich w większości odpowiada za stymulację ekspresji genów białek lipogenezy: autoregulacyjnie SREBP1c, ACLY, ACC, FAS, SCD1, GPAT (Wang Y i in. 2015). W formie nieaktywnej (preSREBP1c) białko to jest związane z błoną ER, gdzie w odpowiedzi na stymulację, np. przez insuline lub niedobór steroli, dochodzi do proteolitycznego cięcia białka i uwolnienia formy aktywnej (mSREBP1c) (Shao i Espenshade 2014). mSREBP1c jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie wiąże się do sekwencji odpowiedzi na sterole (ang. sterol response elements, SREs) w obrębie promotorów wspomnianych genów lipogenezy, zwiększając ich ekspresję (Shao i Espenshade 2014). Aktywność SREBP1c może być regulowana przez fosforylację, np. inhibująca przez białkową kinazę A (ang. protein kinase A, PKA) (Lu i Shyy 2006), acetylację lub deacetylację (Ponugoti i in. 2010). SREBP1c może ulegać również degradacji w proteasomach (Hirano i in. 2001). U pacjentów z syndromem metabolicznym stwierdzono zwiększoną ekspresję genu Srebf1, kodującego białko SREBP1c, i poziom zmagazynowanych lipidów (Marfella i in. 2009), a myszy pozbawione SREBP1c były bardziej skłonne do rozwoju zaburzeń rytmu serca po zawale, w związku z zaburzoną odpowiedzią na stymulację układu przywspółczulnego (Park i in. 2008).

Kolejnym istotnym czynnikiem transkrypcyjnym jest wątrobowy receptor X α (ang. *liver X receptor a*, LXR α), który po związaniu ligandu – oksysterolu, tworzy heterodimer ze wspomnianym już RXR i przyłącza się do sekwencji promotorowych genów kodujących SREBP1c, ACC, FAS, SCD1 (Sun i in. 2016). Czynnikiem aktywującym LXR α jest insulina, natomiast hamującymi PKA i AMPK poprzez fosforylację (Hwahng i in. 2009, Yamamoto i in. 2007, Sun i in. 2016). Myszy pozbawione LXR α w warunkach TAC były bardziej podatne na rozwój dysfunkcji serca i miały zmniejszony wychwyt glukozy przez ten organ, natomiast nadekspresja genu kodującego LXR α w tych samych warunkach (TAC) chroniła serce przed przerostem, zwłóknieniem i dysfunkcją (Cannon i in. 2015). Innymi czynnikami transkrypcyjnymi wpływającymi na lipogenezę są ChREBP (ang. *carbohydrate-responsive element-binding protein*) i USF1 (ang. *upstream stimulatory factor 1*), które w odpowiedzi na wysokie stężenie glukozy i insuliny są transportowane do jądra, gdzie wiążą się do sekwencji promotorowych (Wang Y i in. 2015).

Regulacja potranslacyjna lipogenezy obejmuje głównie fosforylację i O-GlcNAcylację białek tego procesu (Baldini i in. 2016). Począwszy od pierwszych etapów syntezy FAs *de novo*, fosforylacja może być aktywująca (jak np. ACLY; Batchuluun i in. 2022) lub hamująca (w przypadku ACC; Dyck i in. 1999). ACC podlega fosforylacji przez PKA,

a w warunkach wysokiego poziomu AMP także przez AMPK, czyli w sytuacjach głodzenia, stresu lub wysiłku fizycznego (Dyck i in. 1999). Poziom pACC ma duże znaczenie w regulacji utleniania FAs w mitochondriach, co zostało opisane w kolejnych rozdziałach.

Do allosterycznej regulacji lipogenezy zalicza się dostępność np. cytrynianu, który aktywuje ACLY i ACC, której aktywność z kolei jest hamowana przez długołańcuchowe FAs (Wei i in. 2020, Batchuluun i in. 2022). Sam enzym ACLY jest regulowany allosterycznie przez wiele metabolitów, np. aktywująco przez glukozo- oraz fruktozo-6-fosforan lub hamująco przez szczawiooctan i acetylo-CoA (Batchuluun i in. 2022).

3.1.3. Synteza kropli lipidowych

LD jest organellum podlegającym ciągłym, dynamicznym zmianom – wzrostu, redukcji lub równowagi tych dwóch procesów, co jest szczególnie charakterystyczne dla serca (Banke i in. 2010, Wang i in. 2013). FAs w związku ze swoimi właściwościami fizyko-chemicznymi, a także zdolnością do oddziaływania z różnymi białkami, np. czynnikami transkrypcyjnymi, w nadmiarze prowadzą do wielu zaburzeń, np. dysfunkcji mitochondriów, nadprodukcji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) i apoptozy kardiomiocytów (Jump 2004, Hac-Wydro i Wydro 2007, D'Souza i in. 2016, Dludla i in. 2020, Perna i Hewlings 2022). Aby zapobiec wspomnianym negatywnym efektom, FAs są inkorporowane w postaci TG lub estrów cholesterolu (ang. *cholesteryl esters*, CE) do LDs (Olzmann i Carvalho 2019).

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, synteza TG przebiega w przestrzeni między błonami ER i w tym miejscu też ma początek synteza LDs (Olzmann i Carvalho 2019). Synteza LDs jest stymulowana w podobny sposób jak lipogeneza, ponieważ są to procesy ściśle ze sobą powiązane, tj. przez nadmiar glukozy i FAs, ale również w sytuacjach stresowych, np. przez nadmierne głodzenie, podwyższony poziom ROS, stres ER (Zadoorian i in. 2023). Po przekroczeniu wartości 5 mol% przez TG w błonie ER dochodzi do jej uwypuklenia, utworzenia tzw. "soczewki", która w towarzystwie różnych białek zmieniających napięcie powierzchniowe, m.in. perylipin (ang. perilipin, PLIN), rośnie, dojrzewa i odłącza się od ER (Ryc. 2) (Olzmann i Carvalho 2019). We wnętrzu utworzonej LD są zarówno TG jak i CE, otoczone pojedynczą warstwą fosfolipidów wraz z różnymi białkami (Zadoorian i in. 2023). Szacuje się, że liczba białek związanych z LDs oscyluje między 100 a 150 (Bersuker i in. 2018). Należą do nich m.in. białka lipogenezy, takie jak GPAT, DGAT, oraz estryfikacji cholesterolu, np. acylotransferaza acylo-CoA:cholesterol (ang. sterol O-acyltransferase 1, SOAT1), które biorą udział we wzroście LD po jej odłączeniu się od ER (Ryc. 2) (Olzmann i Carvalho 2019, Batchuluun i in. 2022). Kolejnym ważnym białkiem biorącym udział w wielu procesach związanych z LDs jest PLIN, która w sercu występuje głównie w izoformie PLIN5 (Ryc. 2) (Drevinge i in. 2016, Andersson i in. 2017, Itabe i in. 2017). PLINs biora udział w tworzeniu i stabilizowaniu LDs (Carr i in. 2014), oddziaływaniu z innymi organellami, np. lizosomami, mitochondriami, LDs (Valm i in. 2017) oraz z białkami szlaku lipolizy, wpływajac na tempo degradacji LDs (Yamaguchi i in. 2007). Badania wykazały, że brak PLIN5 w sercu skutkuje drastycznym ograniczeniem zawartości TG w wyniku braku LDs, podwyższonym tempem utleniania FAs i nadprodukcją ROS (Kuramoto i in. 2012). W warunkach stresowych usunięcie genu kodującego PLIN5 prowadziło do dysfunkcji serca i zwiększonej śmiertelności myszy (Drevinge i in. 2016), w związku z obniżoną wydajnością mitochondriów w kardiomiocytach (Andersson i in. 2017).

3.1.4. Lipoliza w sercu

3.1.4.1. Mechanizm lipolizy

Lipoliza, czyli enzymatyczna hydroliza wiazań estrowych w TG, DAG i MAG między cząsteczką FA a glicerolu, jest procesem stosunkowo aktywnym w sercu, ponieważ stopniowe uwalnianie FAs w wyniku lipolizy dostarcza je do mitochondriów w sposób bezpieczny dla kardiomiocytów (Banke i in. 2010, Roussel i in. 2015). Pierwszym enzymem decydującym o tempie lipolizy jest swoista dla adipocytów lipaza triacyloglicerolowa (ang. adipose triglvceride lipase, ATGL), która hydrolizuje wiązanie w pozycji sn-2 lub sn-1, tworząc odpowiednio sn-1,3-DAG lub sn-2,3-DAG (Zechner i in. 2017). Co ciekawe sn-1,2-DAG, będący cząsteczką sygnałową, nie powstaje w wyniku reakcji katalizowanej przez ATGL, lecz fosfolipaze C (ang. phospholipase C, PLC) (Zheng i in. 2023). Przeprowadzone badania wykazały, że pozbawienie myszy białka ATGL powoduje przedwczesną śmierć w wyniku ciężkiej niewydolności serca (ang. heart failure, HF), natomiast stymulowany brak ATGL u dorosłych osobników wywołuje stłuszczenie, zwłóknienie i HF, za sprawą niedoboru FAs prowadzacego do spadku aktywności PPARa i PGC-1a, tempa utleniania FAs, dysfunkcji mitochondriów, łańcucha transportu elektronów i obniżenia produkcji ATP (Haemmerle i in. 2006, Kienesberger i in. 2013). Inne badania wykazały, że nadekspresja Pnpla2, genu kodującego ATGL, zmniejsza poziom TG w sercu i pomimo spadku tempa utleniania FAs w modelach HF związanej z T2D, dietą wysokotłuszczową lub TAC funkcje serca były zachowane, w związku ze wzrostem utleniania glukozy (Kienesberger i in. 2012, Pulinilkunnil i in. 2013). Kolejnym enzymem zaangażowanym w lipolizę jest lipaza zależna od hormonów (ang. hormone-sensitive lipase, HSL), hydrolizująca głównie DAG w pozycji sn-3 do MAG i FA (Zechner i in. 2017). Nadekspresja Hsl w sercach myszy obniżyła magazynowanie LDs, rozwój zwłóknienia i lipotoksyczność poprzez zwiekszony rozkład utlenionych form lipidów, bez zaburzenia funkcji mitochondriów (Ueno i in. 2008). Z drugiej strony, usunięcie genu HSL zwiększyło wychwyt glukozy i zmniejszyło poziom TG w sercu myszy na diecie HFD (Park i in. 2005), a także zachowało funkcje skurczową serca w warunkach głodzenia (Suzuki i in. 2009). Ostatni FA jest uwalniany od glicerolu przez lipazę monoacyloglicerolu (ang. monoacyglycerol, MAGL) (Zechner i in. 2017).



Ryc. 3. Proces lipolizy i jego regulacja. AC, cyklaza adenylanowa; ABHD5, O-acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3-fosforanu; ATGL, swoista dla adipocytów lipaza triacyloglicerolowa; ATP, adenozyno-5'-trifosforan; cAMP, cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; DAG, diacyloglicerol; FA, kwas tłuszczowy; G0S2, przełącznik molekularny faz G0/G1 cyklu komórkowego; HSL, lipaza zależna od hormonów; MAG, monoacyloglicerol; MAGL, lipaza monoacyloglicerolu; PKA, kinaza białkowa A; TG, triacyloglicerole (zaadaptowano z Olzmann i Carvalho 2019).

3.1.4.2. Regulacja lipolizy

Wśród wielu czynników aktywujących lipolizę są m.in. głodzenie, stymulacja układu β -adrenergicznego, kurczenie się komórek mięśniowych i Ca²⁺; z kolei insulina oraz FAs hamują ten proces (Zechner i in. 2017, Collins i in. 2018).

Białkiem pozytywnie regulującym lipolizę jest O-acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3fosforanu (ang. *1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase / \alpha/\beta-hydrolase domaincontaining protein 5*, ABHD5) znane również jako CGI-58 (ang. *comparative gene identification-58*), które w stanie nieaktywnym jest związane z PLIN5 na powierzchni LD. Fosforylacja przez PKA powoduje odłączenie ABHD5 od PLIN5, związanie się z ATGL i zwiększenie aktywności lipazy, poprzez zaburzenie warstwy fosfolipidowej LD i "otwarcie" dostępu ATGL do TG (Ryc. 3) (Brown i Brown 2017, Zechner i in. 2017). W badaniach przeprowadzonych na myszach pozbawionych ABHD5 wykazano, że rozwijają one HF w związku ze znacznym magazynowaniem lipidów w sercu, dysfunkcją mitochondriów i wysokim poziomem ROS (Xie i in. 2021). PKA może zwiększać aktywność ATGL poprzez bezpośrednią fosforylację lipazy (Ryc. 3) (Pagnon i in. 2012). Jony Ca²⁺ aktywują cyklazę adenylanową (ang. *adenylyl cyclase*, AC), która przekształca ATP do cAMP, który z kolei jest aktywatorem kinazy PKA (Ryc. 3) (Dhalla i in. 1977, Schwartz i in. 1993, Zangenberg i in. 2001, Chen i in. 2012, Cerk i in. 2018).

Białkiem hamującym lipolizę jest przełącznik molekularny faz G0/G1 cyklu komórkowego (ang. *G0/G1 switch protein 2*, G0S2), który oddziałuje z miejscem wiązania FAs, a więc wpływa na ATGL niezależnie od ABHD5 i hamuje jej aktywność nawet w kompleksie ATGL-ABHD5 (Ryc. 3) (Heier i in. 2015, Zechner i in. 2017). Pozbawienie myszy białka G0S2 chroni je przed magazynowaniem lipidów w sercu wywołanym nadmiernym głodzeniem, natomiast wzmożona ekspresja *G0s2* wywołała efekt podobny do

braku ATGL, tj. magazynowanie TG w sercu, lecz bez rozwoju zwłóknienia, przebudowy i spadku funkcji skurczowej serca (Ma i in. 2014, Heier i in. 2015). Mechanizm hamowania lipolizy przez insulinę, polega na aktywacji transkrypcji *G0s2*, podczas gdy układ β-adrenergiczny i głodzenie obniżają ekspresję *G0s2* powodując aktywację lipolizy (Ryc. 3) (Schweiger i in. 2012, Zechner i in. 2017). Długołańcuchowe FAs hamują aktywność ATGL w sposób niekonkurencyjny (ang. *non-competitive*) (Nagy i in. 2014), a sama lipaza może ulegać ubikwitynacji, przez co jest degradowana i spada jej zawartość w komórce (Ding i in. 2021).

3.1.5. Rola SCD w metabolizmie

SCD jest białkiem błonowym ER, gdzie w bliskim towarzystwie DGAT2 bierze udział w procesie lipogenezy (Man i in. 2006). Fundamentalne znaczenie dla aktywności katalitycznej wszystkich izoform SCD mają trzy konserwowane motywy histydynowe tworzące miejsce wiązania dla jonów żelaza (Miyazaki i in. 2003, Shen i in. 2020). SCD katalizuje kluczową dla tempa lipogenezy reakcję utworzenia podwójnego wiązania między atomami węgla w pozycji $\Delta 9$ i $\Delta 10$ w łańcuchu SFA, co skutkuje powstaniem MUFA (Ryc. 4). Substratami dla SCD są przede wszystkim 18:0 i 16:0, które są transformowane do 18:1 i 16:1, odpowiednio (Paton i Ntambi 2009, Miyazaki i in. 2006). MUFA w stosunku do SFA są bardziej wydajnie inkorporowane do TG i CE, utleniane w mitochondriach, a także biorą udział w różnych ścieżkach sygnałowych, stąd SCD jest ważnym elementem regulacji metabolizmu lipidów (DeLany i in. 2000, Ricchi i in. 2009, Scott i in. 2022).



Ryc. 4. Schemat reakcji katalizowanej przez SCD. Donorem elektronów dla reakcji, które poprzez FAD i cytochrom b_5 trafiają do akceptora tj. tlenu z wydzieleniem wody, jest NADPH+H⁺. FAD, dinukleotyd flawinoadeninowy, FADH₂, zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy, NADP, fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; NADPH, zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; SCD, desaturaza stearoilo-CoA (zaadaptowano z Tabaczar i in. 2018).

U myszy występują 4 izoformy SCD, których homologia na poziomie sekwencji aminokwasów wynosi ponad 75 % (Miyazaki i in. 2006). SCD1 oraz SCD2 są najbardziej powszechne i występują m.in. w tkance tłuszczowej, skórze, mięśniach, sercu i wątrobie. U dorosłych osobników ekspresja *Scd2* zanika w wątrobie, natomiast jest to dominująca izoforma w mózgu (Ntambi, i in. 1988, Kaestner i in. 1989, Miyazaki i in. 2005, de Moura i in. 2016). SCD3, który wyróżnia się spośród innych izoform metabolizowaniem FAs o długości do 16 atomów węgla, występuje w skórze i oczach (Zheng i in. 2001, Miyazaki i in. 2001, Miyazaki i in. 2006), natomiast SCD4 tylko w sercu (Miyazaki i in. 2003). U ludzi opisano dotychczas 2 izoformy – SCD1, dzielącą 85 % sekwencji aminokwasowej z mysimi izoformami, która ulega ekspresji w całym organizmie, w tym również w sercu, oraz specyficzną dla ssaków naczelnych SCD5, występującą głównie w mózgu i trzustce (Flowers i Ntambi 2008, Igal i in. 2020).

3.1.5.1. SCD1

Myszy pozbawione SCD1 w całym organizmie (ang. global SCD1 knockout, SCD1_{GKO}) mają zahamowany rozwój otyłości i stłuszczenia wątroby w odpowiedzi na różne czynniki, m.in. diete HFD i HCD, oporność na leptyne (A^{y}/a) lub pozbawienie leptyny (ob/ob) (Ntambi i in. 2002, Flowers i Ntambi 2009, Miyazaki i in. 2009, Dobrzyn i in. 2010). W większości wymienionych modeli, oprócz ob/ob, usunięcie SCD1 obniżyło poziom glukozy i TG w osoczu na czczo oraz stłuszczenie wątroby, natomiast zwiększyło wrażliwość na insulinę mięśni i wątroby. Mechanizm, przez jaki wyciszenie ekspresji Scd1 obniża poziom stłuszczenia ciała myszy, pomimo zwiększonego spożycia pokarmu, polega na zwiększeniu tzw. "wydatku energetycznego" (ang. energy expenditure) (Ntambi i in. 2002, Sampath i in. 2009). Natomiast zmniejszona zawartość TG w wątrobie wynika z zahamowania ekspresji genów kodujących białka lipogenezy (SREBP1c, ACC, FAS, ELOVL6) i zwiększonego utleniania FAs, w związku z wyższą ekspresją genów zaangażowanych w ten proces, jak i aktywacją AMPK (Ntambi i in. 2002, Dobrzyn i in. 2004, Miyazaki i in. 2009). Wyjątek stanowiły myszy ob/ob, u których w wyniku usunięcia SCD1 nie spadła ekspresja Srebf1 w wątrobie i zawartość TG w osoczu, a poziom insuliny i glukozy wzrósł, wskazując na obniżenie wrażliwości na insulinę i wymaganą obecność funkcjonalnego genu leptyny do wystąpienia części pozytywnych efektów związanych z brakiem SCD1 (Flowers i in. 2007, Miyazaki i in. 2009). Szczegółowa charakterystyka wpływu usunięcia SCD1 zarówno w całym organizmie jak i specyficznie w różnych narządach została przedstawiona w Tabeli 1.

Myszy pozbawione SCD1 tylko w skórze (ang. *skin-specific SCD1 knockout*, SCD1_{SKO}) w dużej mierze odzwierciedlały fenotyp myszy SCD1_{GKO}. Zwierzęta SCD1_{SKO} charakteryzowały się zwiększonym wydatkiem energetycznym w związku ze zwiększoną termogenezą, zahamowanym rozwojem otyłości i stłuszczeniem wątroby, pomimo zwiększonego spożycia pokarmu i, w przeciwieństwie do myszy SCD1_{GKO}, niezmienionej ekspresji prawie wszystkich genów lipogenezy w wątrobie w warunkach HFD, oprócz *Srebf1* (Sampath i in. 2009). Zwiększona termogeneza była efektem wyższej ekspresji genów lipolizy, utleniania FAs w wątrobie, mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej. Pomimo, że myszy SCD1_{SKO} w warunkach standardowych i HFD przejawiały tylko tendencję spadkową w stężeniu glukozy w osoczu na czczo, to wykazano u tych zwierząt wyższą tolerancję glukozy, a poziom insuliny, leptyny i cholesterolu nie zmienił się w odpowiedzi na karmienie HFD. Dodatkowo brak SCD1 w skórze zwiększył wrażliwość zwierząt na zimno, co było spowodowane gwałtownym wyczerpaniem niskich zapasów glikogenu w wątrobie, a także hipoglikemią (Sampath i in. 2009).

Wyciszenie Scd1 wyłącznie w wątrobie (ang. liver-specific SCD1 knockout, SCD1_{LKO}), w tkance thuszczowej (ang. adipose-specific SCD1 knockout, SCD1_{AKO}), w obu wspomnianych tkankach (ang. liver- and adipose-specific SCD1 knockout, SCD1_{LAKO}) lub w jelicie (ang. intestine-specific SCD1 knockout, SCD1_{IKO}) w warunkach HFD lub oporności na leptynę był niewystarczający do zahamowania rozwoju otyłości, zmniejszenia masy tkanki tłuszczowej, jak również obniżenia glukozy na czczo i zwiększenia wrażliwości na insulinę (Miyazaki i in. 2007, Miyazaki i in. 2009, Flowers i in. 2012, Burchat i in. 2022). W warunkach HFD myszy prawie wszystkich genotypów, z wyjątkiem myszy SCD1_{IKO}, rozwijały nietolerancję glukozy (Miyazaki i in. 2007, Miyazaki i in. 2009, Flowers i in. 2012, Burchat i in. 2022). Natomiast w modelu oporności na leptynę myszy SCD1_{LKO} i SCD1_{LAKO} miały zwiększoną tolerancję na glukoze, a ponadto obniżoną zawartość TG w osoczu i w wątrobie (Flowers i in. 2012). Myszy SCD1_{AKO} oporne na leptynę również miały niższą zawartość TG w wątrobie (Flowers i in. 2012). Brak SCD1 w jelicie, ale nie pozostałe tkankowo-specyficzne usuniecia genu SCD1, spowodował większe spożycie pokarmu w związku z większym wydatkiem energetycznym (Burchat i in. 2022, Burchat i in. 2024). Mimo że brak SCD1 w wątrobie nie chroni przed otyłością wywołaną HFD i nie wpływa na wydatek energetyczny zwierzat, to w warunkach HCD ma pozytywny wpływ, zmniejszając masę ciała i tkanki tłuszczowej, zawartość TG w wątrobie i osoczu, poprzez spadek ekspresji genów kodujących białka lipogenezy (FAS, ACC, ELOVL6) i dojrzewania SREBP1c oraz zahamowanie syntezy FAs (Miyazaki i in. 2007, Flowers i in. 2012). Co ciekawe brak SCD1 w jednej z tkanek, watrobie lub tkance tłuszczowej, spowodował spadek zawartości MUFA w drugiej z nich (Flowers i in. 2012). Nadekspresja Scd1 w mięśniach szkieletowych i sercu myszy obniżyła masę ciała i poziom glukozy w osoczu na czczo, nie wpływając na tolerancję glukozy, jednak zwiększyła zawartość TG w mięśniach. Myszy te były również bardziej aktywne lokomotorycznie, a w mieśniach stwierdzono zwiększoną ilość mitochondriów i tempo utleniania FAs, w związku ze zwiększoną dostępnością ligandów PPARô i wyższą ekspresją genów zaangażowanych w utlenianie FAs (Rogowski i in. 2013). Z drugiej strony, nadekspresja Scd1 w ludzkich hepatocytach spowodowała zwiększone magazynowanie TG w wyniku zwiększenia poziomu mRNA genów lipogenezy, a obniżenia ekspresji genów utleniania FAs (Cao i in. 2020).

Tabela 1. Wpływ usunięcia SCD1 w całym organizmie lub tkankowo-specyficznego na metabolizm w różnych modelach otyłości. chow, standardowa pasza laboratoryjna; HFD, dieta wzbogacona w tłuszcze; HCD, dieta wysokowęglowodanowa; ob/ob, zwierzęta pozbawione funkcjonalnej leptyny; A^{y}/a , zwierzęta z opornością na leptynę; $SCD1_{GKO}$, usunięcie SCD1 w całym organizmie; $SCD1_{SKO}$, usunięcie SCD1 w skórze; $SCD1_{LKO}$, usunięcie SCD1 w wątrobie; $SCD1_{AKO}$, usunięcie SCD1 w tkance tłuszczowej; $SCD1_{LAKO}$, usunięcie SCD1 w wątrobie i tkance tłuszczowej; $SCD1_{IKO}$, usunięcie SCD1 w jelicie; b.d., brak danych.

	czynnik	Genotyp zwierząt					
	wywołujący otyłość	SCD1 _{GKO}	SCD1 _{SKO}	SCD1 _{LKO}	SCD1 _{AKO}	SCD1 _{LAKO}	SCD1 _{IKO}
	HFD	zahamowany	zahamowany	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian
rozwój	HCD	zahamowany	b.d.	zahamowany	b.d.	b.d.	bez zmian
otyłości	ob/ob	zahamowany	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	zahamowany	b.d.	bez zmian	bez zmian	bez zmian	b.d.
	chow	zwiększone	zwiększone	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian
_	HFD	zwiększone	zwiększone	bez zmian	bez zmian	bez zmian	zwiększone
spożycie	HCD	zwiększone	b.d.	bez zmian	b.d.	b.d.	bez zmian
каппу	ob/ob	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	zwiększone	b.d.	bez zmian	bez zmian	bez zmian	b.d.
wydatek energetyczny	chow	zwiększony	zwiększony	bez zmian	b.d.	b.d.	zwiększony
	chow	obniżona	bez zmian	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
zawartość	HFD	obniżona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian
glukozy w	HCD	obniżona	b.d.	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
czczo	ob/ob	zwiększona	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	obniżona	b.d.	bez zmian	bez zmian	bez zmian	b.d.
zawartość	chow	obniżona	bez zmian	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
insuliny w	HFD	obniżona	obniżona	bez zmian	b.d.	b.d.	zwiększona
osoczu na	HCD	bez zmian	b.d.	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
CZCZO	ob/ob	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.

	A ^y /a	obniżona	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	chow	zwiększona	zwiększona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	b.d.
	HFD	zwiększona	zwiększona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	b.d.
wrażliwość	HCD	zwiększona	b.d.	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
na msunnę	ob/ob	pogłębienie zaburzenia	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	zwiększona	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	chow	polepszona	polepszona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	b.d.
	HFD	polepszona	polepszona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	polepszona
tolerancja	HCD	polepszona	b.d.	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
giukozy	ob/ob	pogłębienie zaburzenia	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	polepszona	b.d.	polepszona	bez zmian	polepszona	b.d.
	chow	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian	obniżona
zawartość	HFD	obniżona	bez zmian	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
TG w osoczu	HCD	obniżona	b.d.	obniżona	b.d.	b.d.	obniżona
na czczo	ob/ob	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	obniżona	b.d.	obniżona	bez zmian	obniżona	b.d.
zawartość	chow	b.d.	bez zmian	bez zmian	b.d.	b.d.	obniżona
cholesterolu	HFD	b.d.	obniżona	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
czczo	HCD	b.d.	b.d.	bez zmian	b.d.	b.d.	bez zmian
	chow	obniżona	obniżona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian
	HFD	obniżona	obniżona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian
masa tkanki	HCD	obniżona	b.d.	obniżona	b.d.	b.d.	b.d.
uuszczowej	ob/ob	obniżona	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	obniżona	b.d.	bez zmian	bez zmian	bez zmian	b.d.
	chow	obniżona	obniżona	bez zmian	bez zmian	bez zmian	bez zmian
	HFD	obniżona	obniżona	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.

zawartość	HCD	obniżona	b.d.	obniżona	b.d.	b.d.	zwiększona
TG w	ob/ob	obniżona	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
wątrobie	A ^y /a	obniżona	b.d.	obniżona	obniżona	obniżona	b.d.
	chow	zahamowana, oprócz SREBP1c	zahamowana	bez zmian	b.d.	b.d.	bez zmian
	HFD	zahamowana	tylko SREBP1c	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
lipogeneza w	HCD	b.d.	b.d.	zahamowana	b.d.	b.d.	zahamowana
wątrobie	ob/ob	zahamowana, oprócz SREBP1c	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	zahamowana	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
utlenianie	chow	zwiększona	zwiększona	bez zmian	b.d.	b.d.	zahamowana
FAs w wątrobie	HFD	b.d.	zwiększona	b.d.	b.d.	b.d.	bez zmian
	chow	obniżona	bez zmian	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
zawartość	HFD	obniżona	obniżona	bez zmian	b.d.	b.d.	b.d.
glikogenu w	HCD	obniżona	b.d.	obniżona	b.d.	b.d.	b.d.
wątrobie	ob/ob	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
	A ^y /a	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.
Piśmiennictwo		Ntambi i in. 2002, Miyazaki i in. 2004, Miyazaki i in. 2007, Miyazaki i in. 2009	Sampath i in. 2009, Flowers i in. 2011	Miyazaki i in. 2009, Flowers i in. 2012, Aljohani i in. 2019	Hyun i in. 2010, Flowers i in. 2012	Flowers i in. 2012	Burchat i in. 2022, Burchat i in. 2024

3.1.5.2. SCD2 i SCD3

SCD2 pełni kluczową rolę podczas rozwoju nowo narodzonych myszy, biorąc udział w syntezie lipidów w wątrobie i skórze. Ekspresja Scd2 w wątrobie wraz z wiekiem myszy spada, podczas gdy Scd1 rośnie (Miyazaki i in. 2005). Pozbawienie myszy białka SCD2 w całym organizmie (SCD2^{-/-}) powoduje wysoką śmiertelność (70-100 %) myszy 24 godz. po narodzeniu w związku z zaburzoną barierą lipidową skóry (m.in. spadek zawartości TG i udziału MUFA) i jej suchościa, pomimo zwiekszonej ekspresji Scd1 i Scd3. Co ciekawe, dorosłe myszy SCD2^{-/-}, w przeciwieństwie do SCD1_{GKO}, miały normalne gruczoły łojowe i porost włosów. Zawartość TG i MUFA w wątrobie nowo narodzonych myszy, ale nie dorosłych osobników, były obniżone przez usunięcie SCD2 w związku z obniżoną aktywnością SCD i zahamowana lipogeneza (Miyazaki i in. 2005). Badania z wykorzystaniem dorosłych myszy SCD2^{-/-} wykazały, że podobnie do SCD1_{GKO}, są one oporne na rozwój otyłości i zwiększenie masy tkanki tłuszczowej wywołane dieta HFD i HCD. Myszy te maja zachowana wrażliwość na insulinę i tolerancję glukozy, ale poziom glukozy w osoczu w warunkach HFD był niezmieniony, podobnie jak wydatek energetyczny, zmierzony w postaci wykorzystanego tlenu, pomimo zwiększonej ekspresji genu kodującego białko rozprzegające (ang. uncoupling protein, UCP) i PGC-1a w brunatnej tkance tłuszczowej (O'Neill i in. 2020). Co ciekawe, wydatek energetyczny był zwiększony przez zahamowanie ekspresji Scd2 w samym mózgu myszy w warunkach HFD, a ponadto stwierdzono wyższą aktywność lokomotoryczną i brak zmian w ilości spożywanej karmy, co przełożyło się na spowolnienie przybierania masy i obniżenie masy zmagazynowanej tkanki tłuszczowej (de Moura i in. 2016). Ponadto myszy SCD2^{-/-} karmione HFD, ale nie HCD, miały powiększoną watrobę, natomiast mniejsze adipocyty w tkance tłuszczowej (O'Neill i in. 2020), co łączy się z kluczową rolą SCD2 w adipogenezie zależnej od PPARy (Christianson i in. 2008).

Ekspresja *Scd3* jest bardzo ograniczona, tj. dotychczas opisano jej występowanie tylko w skórze i oczach, gdzie uczestniczy w produkcji sebum (Zheng i in. 2001, Miyazaki i in. 2001). Pozbawienie myszy białka SCD1 w całym organizmie spowodowało całkowite zahamowanie ekspresji *Scd3* w skórze, co wpłynęło na spadek zawartości 16:1 i 18:1. Podanie myszom testosteronu częściowo odwróciło ten efekt, tj. wzrosła ekspresja *Scd3* i zawartość 16:1, ale nie 18:1, co potwierdza specyficzność SCD3 względem 16:0, ale nie 18:0, jako substratu reakcji (Miyazaki i in. 2002, Miyazaki i in. 2006). Na chwilę obecną brak jest badań na temat wpływu usunięcia SCD3 na metabolizm myszy.

3.1.5.3. Funkcje sercowo-specyficznej SCD4

Dotychczasowe badania skupiały się na SCD1 oraz SCD2, podczas gdy SCD4 pozostaje izoformą najsłabiej poznaną. Pomimo wysokiej homologii sekwencji aminokwasowej wszystkich SCD, transkrypt *Scd4* jest znacznie mniejszy od pozostałych izoform (3,1 kilozasad (kz) i 4,9 kz, odpowiednio) (Miyazaki i in. 2003). Oprócz dominującego transkryptu występują jeszcze dwa mniejsze 2,8 kz i 1,5 kz co wynika z obecności licznych powtórzeń GAAA w ostatnim, szóstym egzonie, będących miejscem dla poliadenylacji (Miyazaki i in. 2003). Białko SCD4 składa się z 353 aminokwasów, o 79 % identyczności z sekwencjami SCD1-3, tworzących cztery domeny transbłonowe oraz trzy motywy histydynowe konserwowane w 100 % wśród wszystkich SCD, będące kluczowe dla katalizowania reakcji desaturacji

(Ryc. 5) (Miyazaki i in. 2003). Ekspresja Scd4, podobnie jak Scd1, jest indukowana przez agonistów LXRa i HCD, ale w przeciwieństwie do Scd1, w związku z brakiem SRE oraz elementu odpowiedzi na PUFA w sekwencji promotorowej genu, nie jest hamowana przez PUFA (Miyazaki i in. 2003, Dobrzyn i in. 2015). Zwiększony poziom mRNA Scd4 w sercu myszy ob/ob i odwrócenie tego efektu przez podskórne podanie leptyny wskazuje, że ekspresja Scd4 w sercu znajduje się pod kontrolą leptyny, co nie ma miejsca w przypadku Scd1 i Scd2 (Miyazaki i in. 2003). Brak SCD1 w sercu, przy zwiększonej ekspresji Scd4, ale nie Scd2, wywołał 30 % spadek 16:1 i 18:1, w porównaniu do 70 % spadku w wątrobie myszy SCD1_{GKO}, co wskazuje na kluczową rolę SCD4 w syntezie MUFA w sercu (Miyazaki i in. 2003). Myszy z nadekspresją genu kodującego białko ACS w sercu charakteryzowały się zwiększoną zawartością TG, zaburzona strukturą włókien miozynowych i zwłóknieniem, co prowadziło do rozstrzeni, przerostu i dysfunkcji skurczowej serca, czemu towarzyszyła zwiększona ekspresja Scd1 i Scd4 (Lee i in. 2004, Dobrzyn i in. 2015). Zahamowanie ekspresji Scd4 u myszy, nie wpłynęło na wywołany przez MI wzrost masy serca i zawartości białka HIF1a oraz peptydu natriuretycznego typu A (ang. atrial natriuretic peptide, ANP), będącego markerem MI, ale obniżyło w sercu poziom białka czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor A, VEGF-A) względem grupy bez zawału serca (sham). Region oddziaływania SCD4 prawdopodobnie wykracza poza serce, ponieważ u myszy SCD4^{-/-} MI, w przeciwieństwie do WT MI, nie stwierdzono wzrostu zawartości czynników proangiogennych w osoczu (Gan i in. 2022). Brak SCD4 nie wpłynął na spowodowany przez MI spadek zawartości białek utleniania FAs (PPARa, PGC-1a oraz CPT1), natomiast obniżył poziom fosforylacji AMPK, komórkowego czujnika statusu energetycznego. Ponadto, SCD4 bierze udział w regulacji homeostazy ROS w sercu, gdyż myszy SCD4^{-/-} MI miały obniżony poziom białek podjednostek oksydazy NADPH odpowiedzialnej za syntetyzowanie ROS (Gan i in. 2022). Najnowsze doniesienie literaturowe wskazuje, że brak SCD4 aktywuje lipolizę w mysich pierwotnych kardiomiocytach, nawet w obecności 18:0, który hamował wspomniany proces w kardiomiocytach z grupy WT (Wolosiewicz i in. 2024). Ponadto SCD4 wpływa na kurczliwość komórek serca, tj. pierwotne kardiomiocyty SCD4^{-/-} miały zwiększoną amplitudę skurczu, a także szybciej ulegały relaksacji po skurczu, co w przeciwieństwie do kardiomiocytów zwierząt WT, nie ulegało wydłużeniu w warunkach traktowania 18:0 (Wolosiewicz i in. 2024).

SCD1	1	MPAHMLQ-EISSSYTTTTTITAPPSGNEREKVKTVPLHLEEDIRPEMKEDIHDPTYQ
SCD2	1	MPAHILQ-EISGAYSATTTITAPPSGGQQNGGEKFEKSSHHWGADVRPELKDDLYDPTYQ
SCD3	1	MPGHLLOEEMTPSYTTTTTITAPPSGSLONGREKVKTVPLYLEEDIRPEMKEDIYDPTYQ
SCD4	1	MTAHLPO-EISS-RCSTTNIMEPHSRROODGEEKMPLOAEDIRPEIKDDLYDPSYO
	-	
SCD1	57	DEEGPPPKLEYV <u>WRNIILMVLLHLGGLYGIILV</u> PSCK <u>LYTCLFGIFYYMTSALGITAG</u> AH
SCD2	60	DDEGPPPKLEYVWRNIILMALLHLGALYGITLVPSCKLYTCLFAYLYYVISALGITAGAH
SCD3	61	DEEGPPPKLEYVWRNIILMALLHVGALYGITLVPSCKLYTCLFAFVYYVISIEGIGAGVH
SCD4	55	DEEGPPPKLEYVWRNIIFMALLHVGALYGITLVPSCKVYTWLLGVFYNVVAGLGITAGAH
SCD1	117	RLWSHRTYKARLPLRIFLIIANTMAFQNDVYEWARDHRAHHKFSETHADPHNSRRGFFFS
SCD2	120	RLWSHRTYKARLPLRLFLIIANTMAFONDVYEWARDHRAHHKFSETHADPHNSRRGFFFS
SCD3	121	RLWSHRTYKARLPLRIFLIIANTMAFONDVYEWARDHRAHHKFSETHADPHNSRRGFFFS
SCD4	115	RLWSHRTYKARLPLRIFLIMANTMAFONDVYEWARDHRAHHKFSETHADPHNSRRGFFFS
SCD1	177	HVGWLLVRKHPAVKEKGGKLDMSDLKAEKLVMFORRYYKPGLLLMCFILPTLVPWYCWGE
SCD2	180	HVGWLLVRKHPAVKEKGGKLDMSDLKAEKLVMFORRYYKPGLLLMCFVLPTLVPWYCWGE
SCD3	181	HVGWLLVRKHPAVKEKGGKLDMSDLKAEKLVMFORRYYKPGILLMCFILPTLVPWYCWGE
SCD4	175	HVGWLLVRKHPAVKEKGKNLDMSDLKAEKLVMEORRYYKLAVTLMETTLPTLVPWYLWGE
	1,2	
SCD1	237	TFVNSLFVSTFLRYTLVLNATWLVNSAAHLYGYRPYDKNIOSRENILVSLGAVGEGFHNY
SCD2	240	TEVNSLCVSTELRYAVVLNATWLVNSAAHLYGYRPYDKNISSRENILVSMGAVGEGEHNY
SCD3	242	TELNSEYVATLLRYAVVLNATWLVNSAAHLYGYRPYDKNIDPRONALVSLGSMGEGEHNY
SCD4	235	TEOHSI CVSNEL RYAVI I NETWI VNSAAHI YGYRPYDRGTGARENPEVSMASI GEGEHNY
	200	
SCD1	297	HHTFPFDYSASEYRWHINFTTFFIDCMAALGLAYDRKKVSKATVLARIKRTGDGSHKSS
SCD2	300	HHAFPYDYSASEYRWHINFTTFFIDCMALLGLAYDRKRVSRAAVLARIKRTGDGSCKSG
SCD3	301	HHAFPYDYSASEYRWHINFTTFFIDCMAALGLAYDRKRVSKATVLARIKRTGDGSHKSG
SCD4	295	HHTEPYDYSVSEYRWHINETTEEIDCMAALGLAYDRKKVSKAVVLARIKRTGDGSHKSS
Ryc. 5.	Poró	wnanie sekwencji aminokwasowych SCD1-4. Czerwonym podkreśleniem zaznaczono domeny
transbło	nowe,	natomiast żółtym wyróżnieniem konserwowane motywy histydynowe (na podstawie bazy danych
UniProt).	

3.1.5.4. Regulacja desaturacji FAs

Proces desaturacji FAs jest pod ścisłą kontrolą głównie na poziomie transkrypcji. Na przykładzie SCD1 wykazano, że czas półtrwania tego białka wynosi około 3 godz., ponieważ jest ono szybko degradowane w proteasomach (Kato i in. 2006). Z drugiej strony fosforylacja białka SCD1 poprzez receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) zwiększa jego stabilność (Zhang i in. 2017). W obrębie sekwencji promotorowej *Scd1* występują miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, m.in. SREBP1c, LXRα, PPARα, C/EBPα, PGC-1α, a także trijodotyroniny (Waters i in. 1997, Mauvoisin i Mounier 2011, Olichwier i in. 2020). Do czynników pozytywnie wpływających na poziom mRNA *Scd1* zalicza się HCD, insulinę i cholesterol, natomiast hamujący efekt na ekspresję mają trijodotyronina, estrogen, agoniści LXRα, PUFAs oraz, z wyłączeniem serca, leptyna (Waters i Ntambi 1994, Waters i in. 1997, Flowers i Ntambi 2009, Sampath i Ntambi 2005). W sercu leptyna nie wpływa na ekspresję *Scd1* i *Scd2*, natomiast hamuje ekspresję *Scd4*, której poziom mRNA, w przeciwieństwie do *Scd1*, jest niezależny od PUFA (Sessler i in. 1996, Miyazaki i in. 2003).

3.1.5.5. Rola SCD1 w sercu

Dostępne wyniki badań wskazują na zmiany ekspresji Scd w mysich i szczurzych modelach dysfunkcji serca (Balatskyi i Dobrzyn 2023). Stwierdzono zarówno spadek (Bednarski i in. 2022), brak zmian (Dobrzyn i in. 2013), jak i wzrost (Abdalla i in. 2011, Matsui i in. 2012) ekspresji lub aktywności SCD1. Czynnikiem towarzyszącym wszystkim wspomnianym dysfunkcjom serca jest nadprodukcja ROS i spadek syntezy ATP, które sa efektem uszkodzenia mitochondriów (Atici i in. 2023). Usunięcie SCD1 oprócz wspomnianych ogólnoustrojowych pozytywnych efektów, m.in. zahamowania rozwoju otyłości i zwiększenia wrażliwości na insulinę, ma również pozytywny wpływ na metabolizm serca na dwóch poziomach. Pierwszy, niezależny od aktywności PPARα, polega na aktywacji lipolizy poprzez spadek zawartości białka G0S2 i obniżeniu zawartości białek lipogenezy oraz syntezy ceramidów, co przyczyniło się do zmniejszenia szkodliwego magazynowania lipidów w sercu (Bednarski i in. 2016a). Drugi związany jest z obniżeniem aktywności PPARa w wyniku spadku zawartości lipidowych ligandów dla tego czynnika transkrypcyjnego, co prowadziło do obniżenia ekspresji genów zaangażowanych w utlenianie FAs, a w konsekwencji zahamowania tego procesu niezależnie od aktywności AMPK, z jednoczesnym zwiększeniem wykorzystania glukozy w związku z wyższą wrażliwością serca na insulinę (Dobrzyn i in. 2008). Na obniżoną zawartość lipidów w sercach myszy SCD1_{GKO} wpływa również niższy poziom białek transportujących FAs do wnętrza komórki (CD36 i FATP) (Dobrzyn i in. 2008). U otyłych myszy pozbawionych leptyny (ob/ob) wyciszenie ekspresji Scd1 również hamuje transport i utlenianie FAs w sercu, a także obniża poziom lipidów w tym narządzie, co jest powiązane z obniżoną ekspresją genów lipogenezy oraz zmniejszoną syntezą ceramidów, co skutkuje zahamowaniem apoptozy i poprawą funkcji skurczowej serca (Dobrzyn i in. 2010). SCD1 może wpływać na aktywność PPARα, zaangażowanego w regulację wielu procesów, m.in. utleniania FAs, syntezując ligandy dla tego czynnika transkrypcyjnego, np. 18:1 (Dobrzyn i in. 2012). Z drugiej strony zwiększona ekspresja Scd1 w kardiomiocytach in vitro w warunkach traktowania SFA, pomimo zwiększonej akumulacji lipidów, chroniła komórki serca przed nadmierną produkcją ROS i apoptozą, a także zmniejszała katabolizm FAs, a zwiększała glukozy, co stanowiło mechanizm adaptacyjny (Matsui i in. 2012). Jednak w sytuacji narastającego stresu oksydacyjnego, spowodowanego np. dysfunkcją mitochondriów, wspomniany mechanizm adaptacyjny jest niewystarczający i dochodzi do wywołania lipotoksyczności przez zmagazynowane lipidy, np. ceramidy i SFA (Matsui i in. 2012). Nadekspresja Scd1 w sercu myszy spowodowała spadek wydolności i przerost serca, związane z nagromadzeniem lipidów i kwasów tłuszczowych, m.in. 16:0 i 18:0, oraz wzrostem markerów apoptozy w kardiomiocytach (Abdalla i in. 2011). Wykazano również udział SCD1 w procesie autofagii (Ascenzi i in. 2021). Hamowanie aktywności SCD1 w komórkach β trzustki z jednoczesnym traktowaniem 16:0, powoduje spadek fuzji autofagosomów z lizosomami, w związku ze spadkiem zawartości lekkiego łańcucha 3B białek 1A/1B związanych z mikrotubulami (ang. microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3B) (Janikiewicz i in. 2015). W fibroblastach hamowanie SCD1 spowodowało spadek tworzenia autofagosomów, natomiast odwrotny efekt miała nadekspresją Scd1 lub traktowanie produktem SCD1 – 18:1 (Ogasawara i in. 2014).

3.1.6. Utlenianie kwasów tłuszczowych

3.1.6.1. Mechanizm utleniania FAs

Utlenianie FAs zaspokaja do 70 % zapotrzebowania na ATP, którego całkowity obieg, czyli zużycie i zastapienie nowymi cząsteczkami w sercu trwa ok. 10 sek. (Lopaschuk i in. 2021), co świadczy o tym jak ważny jest to proces w kontekście utrzymania prawidłowej funkcji skurczowo-rozkurczowej serca. Etapem decydującym o tempie utleniania FAs jest przyłączenie karnityny do FA-CoA przez białko zewnętrznej błony mitochondrialnej (ang. outer mitochondrial membrane, OMM) acylotransferaze karnitynowa 1 (ang. carnitine palmitoyl transferase 1, CPT1) i powstanie acylokarnityny (Ryc. 6) (Lee i in. 2011). Myszy posiadające CPT1 o obniżonej wrażliwości na inhibitor, tj. malonylo-CoA, rozwijały przerost serca z niewielkim zaburzeniem funkcji tego organu, powiązany ze wzrostem utleniania FAs (van Weeghel i in. 2018). Z drugiej strony spadek aktywności CPT1 w modelu TAC skutkował spadkiem biogenezy mitochondriów w sercu, przerostem i HF, co prowadziło do śmierci tych zwierząt (He i in. 2012). Translokaza karnityno-acylokarnitynowa (ang. carnitine-acylcarnitine translocase, CACT) transportuje acylokarnitynę z przestrzeni międzybłonowej do wnętrza mitochondrium, z którego w przeciwnym kierunku jest przenoszona wolna karnityna. Ostatnim krokiem transportu FAs do wnętrza mitochondrium jest odłączenie karnityny przez CPT2 znajdującą się na wewnętrznej błonie mitochondrialnej (ang. inner mitochondrial membrane, IMM) i powstanie FA-CoA będącego substratem dla kolejnych reakcji (Ryc. 6) (Lopaschuk i in. 2010).

Kolejne etapy utleniania FAs są cyklicznym powtarzaniem czterech reakcji prowadzacych do przekształcenia substratu do acetylo-CoA, zredukowanego dinukleotydu flawinoadeninowego (ang. reduced flavin adenine dinucleotide, FADH₂) i zredukowanego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. reduced nicotinamide adenine dinucleotide, NADH). Pierwszą z nich jest dehydrogenacja FA katalizowana przez dehydrogenazę acylo-CoA bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. very long-chain specific acyl-CoA dehvdrogenase, VLCAD), która podobnie jak reakcja katalizowana przez CPT1, jest uważana za reakcję decydującą o tempie utleniania FAs (Ryc. 6) (Houten i in. 2016). Myszy pozbawione VLCAD miały zwiększony poziom lipidów w sercu oraz zwłóknienie, zaburzony rytm serca (Exil i in. 2003), a także rozwijały HF w związku ze spadkiem ATP w warunkach stresu termicznego (Xiong i in. 2014). Następnie hydratacja powstałego podwójnego wiązania poprzedza kolejną dehydrogenację FA katalizowaną przez dehydrogenazę 3-hydroksyacylo-CoA (ang. 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, HAD) (Ryc. 6) (Houten i in. 2016). Ostatnia reakcją jest odcięcie acetylo-CoA od łańcucha FA przez acetylo-CoA acylotransferazę/tiolazę (ang. acetyl-CoA acetyltransferase, ACAT1), co powoduje skrócenie wejściowego FA o 2 atomy węgla i skierowanie go ponownie na szlak opisanych reakcji, aż do całkowitego utlenienia (Ryc. 6) (Houten i in. 2016).

3.1.6.2. Regulacja utleniania FAs

Utlenianie FAs jest w głównej mierze kontrolowane allosterycznie przez produkt pośredni lipogenezy, czyli malonylo-CoA. Malonylo-CoA jest syntetyzowany przez ACC, która może znajdować się w cytoplazmie (ACC1/ACCα) lub, co jest dominującym miejscem występowania tego enzymu w sercu, w mitochondriach (ACC2/ACCβ) (Abu-Elheiga i in.

2005). Podczas gdy ACC1 odpowiada za syntezę lipidów, ACC2 pełni funkcję regulacyjną utleniania FAs (Abu-Elheiga i in. 2005), syntetyzując w obrębie mitochondriów malonylo-CoA, który wiąże się allosterycznie z CPT1 i hamuje jego aktywność (Ryc. 6) (Lee i in. 2011, Houten i in. 2016). W warunkach takich jak głodzenie lub wysiłek fizyczny dochodzi do aktywacji utleniania FAs przez AMPK, która poprzez fosforylacje hamuje aktywność ACC, powodując spadek poziomu malonylo-CoA (Ryc. 6) (O'Neill i in. 2014). Badania z wykorzystaniem mysiego modelu braku aktywności AMPKβ wykazały rozwój dysfunkcji serca, który nie był powiązany ze zmianami utleniania glukozy i FAs (Sung i in. 2015). Natomiast brak AMPKa jest powiązany z HF spowodowaną zaburzeniem funkcji mitochondriów (Tokarska-Schlattner i in. 2021). Na zawartość malonylo-CoA wpływa również reakcja odwrotna, tj. rozkład malonylo-CoA do acetylo-CoA, katalizowana przez dekarboksylazę malonylo-CoA (ang. malonyl-CoA decarboxylase, MCD), która jest aktywowana przez AMPK (Ryc. 6) (Dyck i in. 2004). Zahamowanie aktywności MCD ex vivo w szczurzych sercach poddanych zabiegowi niedokrwienia miało pozytywny wpływ na funkcje serca i zwiększało utlenianie glukozy przez ten organ, z jednoczesnym obniżeniem utleniania FAs (Dyck i in. 2004). Czynnikiem pozytywnie wpływającym na transport FAs do wnętrza mitochondriów jest dostępność karnityny, aczkolwiek nadmiar acylokarnityny jest toksyczny dla serca (Roussel i in. 2015). Produkty utleniania FAs na zasadzie negatywnej pętli zwrotnej regulują aktywność enzymów tego procesu, np. stosunek FAD/FADH₂, NAD⁺/NADH i acetylo-CoA/CoA, wpływają na aktywność VLCAD, HAD i ACAT1, odpowiednio (Lopaschuk i in. 2021). Hamujący wpływ na utlenianie FAs w sposób pośredni ma również insulina, która stymuluje estryfikację FAs i w ten sposób ogranicza ich dostępność dla mitochondriów i czynników transkrypcyjnych regulujących utlenianie FAs, a ponadto stymuluje lipogenezę np. syntezę malonylo-CoA będącego inhibitorem utleniania FAs (Dyck i in. 2001, Abel 2021).

Regulacja na poziomie transkrypcyjnym ponownie ma ogromne znaczenie w dłuższej perspektywie, w porównaniu z krótkoterminową odpowiedzią opisaną w poprzednim akapicie. Podobnie jak w transporcie FAs do wnętrza komórki, kluczową rolę odgrywają tu czynniki transkrypcyjne PPARα oraz PGC-1α (Lopaschuk i in. 2021), których mechanizm aktywacji został opisany w rozdziale poświęconym transportowi FAs.
Wstęp



Ryc. 6. Procesy utleniania kwasów tłuszczowych, glikolizy i utleniania glukozy. ACAT1, acetylo-CoA acylotransferaza/tiolaza; ACC2, karboksylaza acetylo-CoA 2; AMPK, białkowa kinaza aktywowana przez AMP; CACT, translokaza karnityno-acylokarnitynowa; CPT, acylotransferaza karnitynowa; ECHS1, hydrataza enoilo-CoA; ENO, enolaza; HAD, dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA; HK, heksokinaza; LDH, dehydrogenaza mleczanowa; MCD, dekarboksylazę malonylo-CoA; MPC, mitochondrialny transporter pirogronianu; PDH, dehydrogenaza pirogronianowa; PDK, kinaza dehydrogenazy pirogronianowej; PFK, fosfofruktokinaza; PK, kinaza pirogronianowa; PPAR α , receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α ; VLCAD, dehydrogenaza acylo-CoA bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

3.2. Metabolizm glukozy w sercu

Glukoza, zaraz po FAs, jest drugim najważniejszym substratem energetycznym dostarczającym sercu między 20-40 % zapotrzebowania na ATP (Karwi i in. 2018). Jak zostało opisane we wcześniejszych rozdziałach, glukoza konkuruje z FAs o utlenienie w mitochondriach poprzez tzw. cykl Randle'a (Randle i in. 1963) i jej największe wykorzystanie przypada na okres poposiłkowy, gdy we krwi jest wysoki poziom insuliny blokującej utlenianie FAs (Dyck i in. 2001).

3.2.1. Transport glukozy do kardiomiocytów

Glukoza jest transportowana do wnętrza kardiomiocytów przez białka GLUT na drodze dyfuzji wspomaganej, tzn. zgodnie z gradientem stężeń po obu stronach błony, co już stanowi sposób regulacji transportu glukozy z krwi do kardiomiocytów (Holman i in. 2020). Spośród 14 poznanych izoform tego białka, trzy z nich ulegają ekspresji w sercu w największym stopniu, tj. GLUT1, GLUT4 i GLUT8 (Aerni-Flessner i in. 2012).

Dominującym transporterem w sercu jest GLUT4, odpowiadający za transport glukozy w sposób zależny od insuliny, tak samo jak GLUT8. GLUT4 odgrywa kluczową rolę w zachowaniu funkcji serca w warunkach stresowych, jak np. niedokrwienie, natomiast w warunkach standardowych transport glukozy przeprowadza głównie GLUT1 (Shao i Tian 2015). Myszy pozbawione GLUT4, ale nie GLUT1, w kardiomiocytach charakteryzują się zahamowaniem utleniania FAs w warunkach obciążenia serca przez TAC lub wysiłek fizyczny, a także rozwijają przerost i zwłóknienie serca, apoptozę i obniżoną zdolność do utleniania w mitochondriach, co prowadzi do dysfunkcji serca (Pereira i in. 2014, Wende i in. 2017). W przeciwieństwie do GLUT1, który niezależnie od insuliny jest konstytutywnie obecny w błonie komórkowej, GLUT4 i GLUT8 są w większości przechowywane w cytoplazmie wewnątrz pęcherzyków magazynujących GLUT (ang. GLUT storage vesicles, GSV), które w odpowiedzi na stymulację przez insulinę są transportowane do błony komórkowej (Bertrand i 2020). Insulinowy szlak sygnałowy prowadzi do fosforylacji in. kinazv 3-fosfatydyloinozytolu (ang. phosphoinositide 3-kinase, PI3K), kinazy białkowej B (ang. protein kinase B, AKT) i ostatecznie białka AS160 (ang. AKT substrate of 160 kDa), co powoduje jego inaktywację i odblokowanie translokacji GLUT4 na powierzchnię komórki (Miinea i in. 2005, Bertrand i in. 2020). Regulacja ekspresji Glut4 odgrywa mniejszą rolę i może być hamowana przez FAs (Finck i in. 2003) lub podwyższona przez czynniki transkrypcyjne MEF2, PGC-1a oraz hormony tarczycy (Shao i Tian 2015). Ponadto Ca²⁺ i stymulacja układu β-adrenergicznego zwiększają transport glukozy (Egert i in. 1999, Li i in. 2014), a fosforylacja GLUT4 obniża tempo transportu glukozy niezależnie od translokacji tego białka (Sweeney i in. 1999). Regulacja transportu przez GLUT1 odbywa się głównie na poziomie transkrypcyjnym i jest stymulowana przez niedotlenienie oraz insulinę, a także w warunkach patologicznego przerostu serca, natomiast hamowana przez głodzenie (Shao i Tian 2015).

3.2.2. Utlenianie glukozy w sercu

Po przeniesieniu glukozy do wnętrza komórki przez GLUT, w cytoplazmie następuje proces glikolizy, który można uznać za "przygotowanie" glukozy do utleniania w mitochondriach, poprzez przekształcenie jej do pirogronianu (Tran i Wang 2019). Pierwszym etapem glikolizy jest przekształcenie glukozy do glukozo-6-fosforanu przez heksokinazę (ang. *hexokinase*, HK), a następnie w wyniku szeregu reakcji powstaje 2-fosfoglicerynian podlegający dehydratacji przez enolazę (ang. *enolase*, ENO) i fosforylacji przez kinazę pirogronianową (ang. *pyruvate kinase*, PK) do pirogronianiu (Ryc. 6) (Tran i Wang 2019). Źródłem pirogronianu może być również mleczan w wyniku jego utlenienia przez dehydrogenazę mleczanową (ang. *lactate dehydrogenase*, LDH) (Ryc. 6) (Lopaschuk i in. 2021). Powstały pirogronianiu (ang. *mitochondrial pyruvate carrier*, MPC) i ulega

utlenieniu do acetylo-CoA przez dehydrogenazę pirogronianową (ang. *pyruvate dehydrogenase*, PDH) (Ryc. 6). Acetylo-CoA pochodzący zarówno od glukozy jak i z utleniania FAs jest włączany do cyklu Krebsa, który w połączeniu z łańcuchem transportu elektronów dostarcza komórce energii w postaci cząsteczek ATP (Martínez-Reyes i Chandel 2020).

Utlenianie glukozy jest zależne m.in. od insuliny, która stymuluje ekspresję *Hk* oraz od aktywności HK, która jest hamowana przez produkt katalizowanej przez nią reakcji, glukozo-6-fosforan, w tzw. cyklu Randle'a (Roberts i in. 2015, Chen i in. 2023b). Wysokie tempo utleniania FAs powoduje nagromadzenie acetylo-CoA, który po przekształceniu do cytrynianu hamuje aktywność fosfofruktokinazy (ang. *phosphofructokinase*, PFK) i powoduje nagromadzenie glukozo-6-fosforanu (Ryc. 6) (Hue i Taegtmeyer 2009). Kolejno aktywność PDH przeprowadzającej ostateczną reakcję, czyli utlenienie pirogronianu, jest regulowana przez kinazę dehydrogenazy pirogronianowej (ang. *pyruvate dehydrogenase kinase*, PDK) (Ryc. 6). W sercu dominującą izoformą jest PDK4, która jest aktywowana w warunkach wysokiej zawartości acetylo-CoA, a jej ekspresja podlega regulacji przez PPAR α (Lopaschuk i in. 2010). Brak PDH lub wzmożona ekspresja *Pkd4* w sercu powodują spadek utleniania glukozy z jednoczesnym wzrostem utleniania FAs, co wiąże się ze spadkiem funkcji rozkurczowej serca (Zhao i in. 2008, Gopal i in. 2018). Czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów glikolizy jest ChREBP, który jest aktywowany przez wysokie stężenie glukozy i insulinę (Wang Y i in. 2015).

3.3. Rola mitochondriów w sercu

Serce wymaga ciągłego dostarczania energii, którą kardiomiocyty wykorzystują do kurczenia się i utrzymania prawidłowego funkcjonowania pomp jonowych (Doenst i in. 2013). Niemal cała ilość ATP (95 %) jest syntetyzowana w mitochondriach w wyniku opisanych w poprzednich rozdziałach procesów utleniania FAs i glukozy (Lopaschuk i in. 2021), a następnie w cyklu Krebsa mitochondria przetwarzają otrzymany acetylo-CoA do NADH i FADH₂, które są substratami dla białek łańcucha transportu elektronów (ang. *electron transport chain*, ETC), w wyniku czego dochodzi do syntezy ATP (Martínez-Reyesi i Chandel 2020). W związku z powyższym kardiomiocyty posiadają najwięcej mitochondriów w całym organizmie, tj. około 30 % ich objętości (Schaper i in. 1985). Zaburzenia w funkcjonowaniu mitochondriów są czynnikiem łączącym wzrost utleniania FAs lub glukozy z rozwojem HF (Haemmerle i in. 2006, Glenn i in. 2011, Kolwicz i in. 2012, Kienesberger i in. 2013, Shao i in. 2020, Xie i in. 2021). Chociaż samo zwiększenie wykorzystania jednego z substratów energetycznych nie powoduje rozwoju HF, to dysfunkcja mitochondriów, skutkująca niewystarczającą produkcją ATP do prawidłowego pełnienia funkcji przez serce, jest przyczyną HF (Neubauer 2007, Yang i in. 2022).

Mitochondria są również źródłem ROS, które w warunkach fizjologicznych pełnią funkcje sygnałową w procesach m.in. proliferacji, migracji i angiogenezy. Z drugiej strony organella te pełnią funkcję detoksykacyjną przez enzymy przekształcające ROS, które mogą mieć swoje źródło poza mitochondriami, np. w peroksysomach i błonie komórkowej, do mniej szkodliwego nadtlenku wodoru lub wody (Sies i Jones 2020).

Mitochondria posiadają wiele transporterów różnych jonów, których homeostaza wpływa na aktywność metaboliczną, potencjał błonowy i kurczliwość kardiomiocytów (Singh

2021). Na przykład mitochondria razem z ER regulują równowagę Ca^{2+} w komórce. ER uwalnia Ca^{2+} do cytoplazmy przez kanały rianodynowe (ang. *ryanodine receptor*, RyR) w odpowiedzi na stymulację przez depolaryzację błony komórkowej, a następnie dochodzi do ich wychwytu z powrotem do ER przez sarkoplazmatyczną Ca^{2+} -ATPazę typu 2 (ang. *sarcoplasmic reticulum Ca*²⁺-*ATPase 2*, SERCA2), co skutkuje odpowiednio skurczem i rozkurczem kardiomiocytów (Zhang i in. 2022). W warunkach wysokiego stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, mitochondria współuczestniczą w wychwycie Ca^{2+} za sprawą mitochondrialnych transporterów Ca^{2+} (ang. *mitochondrial Ca*²⁺ *uniporter*, MCU), pełniąc funkcję buforową (Zhang i in. 2022).

Jak zostało wspomniane w rozdziale poświęconym lipogenezie, mitochondria w niewielkim stopniu stanowią miejsce syntezy lipidów regulujących tempo utleniania FAs, ale również budujących błony komórkowe, np. kardiolipiny, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania łańcucha transportu elektronów (Tamura i in. 2020). Oprócz wymienionych funkcji mitochondria, za pośrednictwem przetwarzanych metabolitów, wpływają na apoptozę, ekspresję genów, stan zapalny, modyfikacje DNA i potranslacyjne modyfikacje białek (Martínez-Reyesi i Chandel 2020).

3.3.1. Łańcuch transportu elektronów i fosforylacja oksydacyjna

Fosforylacja oksydacyjna to proces produkcji ATP zachodzący na IMM, z wykorzystaniem gradientu protonowego (potencjału błonowego) wytworzonego przez transport elektronów od donorów (NADH, FADH₂) poprzez pośrednie akceptory elektronów, tj. białka ETC, do ostatecznego akceptora, którym jest tlen.

Pierwszym elementem ETC jest dehydrogenaza NADH, nazywana w skrócie kompleksem I (Ryc. 7). Katalizuje ona reakcję oksydacji NADH, pochodzącego m.in. z utleniania FAs i cyklu Krebsa, do NAD⁺, z przekazaniem dwóch elektronów do ubichinonu i przeniesieniem 4 protonów do przestrzeni międzybłonowej (Zhao i in. 2019). Wykazano, że kompleks I oraz III odpowiadają za produkcję ROS, które są produktem ubocznym wynikającym z zaburzeń transferu, "przeciekania elektronów" (ang. *electron leakage*) do tlenu (Zhao i in. 2019). Usunięcie genu *Ndufs4*, kodującego białko odpowiedzialne za formowanie kompleksu I, w sercu, obniżyło aktywność dehydrogenazy NADH i produkcję ROS, bez zaburzenia funkcji serca jak i struktury mitochondriów. Jednak w warunkach obciążenia serca przez TAC lub wysiłek fizyczny, zahamowana ekspresja *Ndufs4* wywołała apoptozę kardiomiocytów, przerost oraz zaburzoną funkcję skurczową serca niezależnie od ROS (Karamanlidis i in. 2013).

Następnie dehydrogenaza bursztynianowa (kompleks II), będąca jednocześnie elementem cyklu Krebsa, redukuje ubichinon do ubichinolu wykorzystując FADH₂ jako donor elektronów (Ryc. 7) (Zhao i in. 2019). Natomiast w cyklu Krebsa kompleks II utlenia bursztynian do kwasu fumarowego, odnawiając pulę FADH₂ poprzez redukcję FAD. Reakcji tej nie towarzyszy przeniesienie protonów do przestrzeni międzybłonowej (Vanova i in. 2020). Myszy pozbawione SDHAF4, jednego z białek kompleksu II, w sercu, miały nadmierne tempo podziałów, mitofagii i dysfunkcję mitochondriów, prowadzące do niewydolności skurczowej, przerostu, zwłóknienia serca i zwiększonej śmiertelności zwierząt (Wang i in. 2022).

Trzecim enzymem jest oksydoreduktaza ubichinon-cytochrom c (kompleks III), która utlenia powstałe w poprzednich etapach cząsteczki ubichinolu do ubichinonu, z jednoczesnym

redukowaniem cytochromu c i przeniesieniem 4 protonów do przestrzeni międzybłonowej (Ryc. 7) (Zhao i in. 2019). Podobnie jak kompleks I, kompleks III jest źródłem ROS w mitochondriach (Zhao i in. 2019). W warunkach MI obniżenie aktywności kompleksu III, bez zmian w aktywności pozostałych białek ETC, było proporcjonalne do stopnia niewydolności skurczowej serca i było przyczyną znacznego zwiększenia produkcji ROS, bez zmian w liczbie mitochondriów w sercu (Heather i in. 2010).

Ostatnim elementem ETC jest kompleks IV, czyli oksydaza cytochromu c, katalizująca reakcję transferu 4 elektronów z cytochromu c do ostatecznego akceptora, tj. tlenu (Ryc. 7). W wyniku reakcji gradient protonowy zostaje zwiększony przez przeniesienie 4 protonów do przestrzeni międzybłonowej oraz wykorzystanie 4 protonów wewnątrzmitochondrialnych do utworzenia 2 cząsteczek wody (Zhao i in. 2019). Brak genu *Cox7a1*, kodującego mięśniową izoformę białka kompleksu IV, nie wywołał zmian w liczbie ani strukturze mitochondriów, jak również nie powodował zwłóknienia mięśnia sercowego. Jednak serca zwierząt pozbawionych COX7A1 były przerośnięte i charakteryzowały się dysfunkcją skurczową i rozkurczową (Hüttemann i in. 2012).

Syntaza ATP (kompleks V) jest ściśle powiązana z białkami ETC, jednak nie zalicza się do nich. Enzym wykorzystuje utworzony gradient protonowy do syntezy ATP w wyniku reakcji fosforylacji oksydacyjnej (Ryc. 7) (Zhao i in. 2019). Brak jednego z białek kompleksu V, ATPF1, zaburza strukturę grzebieni mitochondrialnych, polaryzację błony mitochondriów, obniża wydajność syntezy ATP, natomiast zwiększa zawartość ROS. Serca pozbawione ATPF1 wykazywały przerost, zwłóknienie i dysfunkcję skurczową serca, w związku z przerostem i apoptozą kardiomiocytów (Zhou i in. 2021).

Podsumowując, do wytworzenia gradientu protonowego (potencjału błonowego) mitochondriów przyczyniają się enzymy kompleksu I, III oraz IV, podczas gdy kompleksy I oraz III uznawane są za główne źródło ROS pochodzenia mitochondrialnego. Energia skumulowana w postaci wytworzonego gradientu protonowego jest wykorzystywana do syntezy ATP poprzez utworzenie wysoce energetycznego wiązania pomiędzy cząsteczką adenozynodifosforanu (ang. *adenosine diphosphate*, ADP) a fosforanem, które może być hydrolizowane w sytuacji zapotrzebowania na energię.

Wstęp



Ryc. 7. Transport elektronów i fosforylacja oksydacyjna w mitochondriach. ADP, adenozynodifosforan; ATP, adenozynotrifosforan; cyt. C, cytochrom C; e⁻, elektron; FAD, dinukleotyd flawinoadeninowy; FADH₂, zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy; H⁺, proton; IMM, wewnętrzna błona mitochondrialna; I, dehydrogenaza NADH (kompleks I); II, dehydrogenaza bursztynianowa (kompleks II); III, oksydoreduktaza ubichinon-cytochrom c (kompleks III); IV, oksydaza cytochromu c (kompleks IV); V, syntaza ATP (kompleks V); NAD⁺, dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; NADH, zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy; OMM, zewnętrzna błona mitochondrialna; ROS, reaktywne formy tlenu.

3.3.2. Kontrola jakości mitochondriów, mitofagia

W poprzednich rozdziałach przedstawiono, jak ważną funkcję w sercu pełnią mitochondria, dostarczając kardiomiocytom ATP do prawidłowego funkcjonowania. W nawiązaniu do tego, istotną rolę pełni proces kontroli jakości tych organelli, który na drodze ich biogenezy, podziału i fuzji (ang. fission-fussion) oraz selektywnej degradacji (mitofagii) usuwa uszkodzone i dysfunkcyjne mitochondria w celu zachowania równowagi energetycznej (Atici i in. 2023). Zaburzenia w procesie mitofagii prowadza do akumulacji nie w pełni funkcjonalnych mitochondriów, rozwoju stanu zapalnego, uszkodzenia tkanki. a w konsekwencji chorób układu sercowo-naczyniowego (ang. cardiovascular disease, CVD) (Atici i in. 2023). W warunkach stresu oksydacyjnego ROS, bedace produktem ubocznym utleniania FAs i fosforylacji oksydacyjnej, naruszają strukturę mitochondrialnego DNA i powodują nagromadzenie błędnie sfałdowanych białek, prowadząc do dysfunkcji mitochondriów (Druzhyna i in. 2008). Stres oksydacyjny oraz dysfunkcja mitochondriów sa głównymi przyczynami zaburzeń funkcji serca w warunkach otyłości i T2D (Shi 2010, Jiménez-González i in. 2020). Mechanizmem, przez jaki dochodzi do nagromadzenia uszkodzonych mitochondriów, jest m.in. stymulowana przez SFA, ale nie MUFA, degradacja receptorów mitofagii, co hamuje ten proces (Chen i in. 2023a), a także zwiększona sztywność błon, m.in. bogatego w PUFA regionu grzebieni mitochondrialnych, co zaburza ich strukturę i uniemożliwia prawidłowe uformowanie kompleksu ETC, prowadząc do wycieku elektronów i powstania ROS (Shi 2010, Jiang i in. 2022).

procesie kontroli jakości mitochondriów ważną rolę odgrywa regulacja W transkrypcyjna przez czynniki PGC-1a, jądrowy czynnik oddechowy 1 (ang. nuclear respiratory factor 1, NRF1), NRF2 i mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (ang. mitochondrial transcription factor A, TFAM). Zarówno wyciszenie jak i nadekspresja Ppargc1a, kodującego białko PGC-1a, wywołały przerost i zaburzenie funkcji skurczowej serca. W pierwszym przypadku przyczyną dysfunkcji serca był spadek ekspresji genów fosforylacji oksydacyjnej, aktywności mitochondriów, zawartości ATP i mitofagii, prowadzący do nagromadzenia uszkodzonych mitochondriów (Kärkkäinen i in. 2019). Natomiast zwiększona ekspresja *Ppargc1a* spowodowała nadmierną liczbę mitochondriów, co zaburzyło strukture sarkomerów (Chen i in. 2022). Brak w sercu funkcionalnego białka TFAM spowodował wysoką śmiertelność związaną z przerostem i zaburzonym rytmem serca, nadmiernym rozmiarem mitochondriów i zaburzoną aktywnością ETC (Wang i in. 1999). Z drugiej strony, nadekspresja Tfam obniżyła zawartość ROS, apoptozę, zwłóknienie i przerost serca, czemu towarzyszyła poprawa funkcji skurczowej serca (Ikeuchi i in. 2005). Czynniki transkrypcyjne NRF1 i NRF2 są konstytutywnie degradowane w proteasomach w sposób zależny od ER lub w wyniku interakcji z białkiem wiążącym NRF2 (ang. kelch-like ECHassociated protein 1, KEAP1), odpowiednio (Komatsu i in. 2010, Hatabaka i in. 2023). W sytuacji stresu, gdy aktywność proteasomów jest niewystarczająca, degradacja NRF1 i NRF2 jest zahamowana, dzięki czemu dochodzi do transkrypcji genów zaangażowanych w proces autofagii, np. p62 (Komatsu i in. 2010, Hatanaka i in. 2023).

Uszkodzone mitochondria podlegają podziałowi przy udziale białka podobnego do dynaminy-1 (ang. dynamin-1-like protein, DRP1) i białka podziału mitochondriów (ang. mitochondrial fission 1 protein, FIS1) w celu pozbycia się części dysfunkcyjnej, tj. z depolaryzowaną błoną i dużą liczbą błędnie sfadowanych białek, a zachowania części mitochondrium o prawidłowej funkcji (Elgass i in. 2013). Zaburzenie podziału mitochondriów w kardiomiocytach poprzez pozbawienie ich DRP1, skutkowało wysoką śmiertelnością nowo narodzonych myszy, w wyniku zahamowania mitofagii prowadzącej do nagromadzenia uszkodzonych mitochondriów i apoptozy kardiomiocytów (Kageyama i in. 2014, Ikeda i in. 2015). U dorosłych zwierząt, indukowane wyciszenie ekspresji Drp1 spowodowało przerost serca, zwłóknienie, spadek funkcji skurczowej, wzrost rozmiaru i liczby uszkodzonych mitochondriów w związku ze spadkiem aktywności mitofagii (Ikeda i in. 2015). Co ciekawe, nadekspresja Drp1, pomimo wywołanej fragmentacji mitochondriów, nie spowodowała zaburzeń w ich funkcjonowaniu jak również zaburzeń funkcji serca (Song i in. 2017). Proces odwrotny, tj. fuzję dwóch mitochondriów, przeprowadzają białka, m.in. mitofuzyna 1 (ang. mitofusin 1, MFN1), MFN2 i GTPaza podobna do dynaminy (ang. dynamin-like GTPase, OPA1) (Ojaimi i in. 2022), a jego zahamowanie przez zwiększoną proteolizę OPA1 skutkowało wysoką fragmentacją mitochondriów, zwłóknieniem, apoptozą, rozstrzenią i HF (Wai i in. 2015). Brak MFN1 lub MFN2, jak również usunięcie obu białek w samym sercu, powodowały śmierć w kilka dni po narodzeniu myszy. Natomiast stymulowane w sercu dorosłych zwierzat obniżenie ekspresji Mfn1 i Mfn2 wywołało fragmentację mitochondriów, spadek pojemności oksydacyjnej i funkcji skurczowej serca (Hall i in. 2016). Kolejnym krokiem mitofagii jest przyłączenie białka Parkin do uszkodzonego mitochondrium, które tworzy na OMM łańcuch ubikwityn – sygnał dla receptora fagofora LC3B i p62, przez co dochodzi do wchłonięcia uszkodzonego organellum do wnętrza autofagosomu (Atici i in. 2023). Usunięcie Parkin u myszy pogłębiło przerost i dysfunkcję rozkurczową serca spowodowaną spożywaniem HFD (Tong i in. 2019).

W biogenezę i podział mitochondriów zaangażowane jest również ER, które dostarcza w regionie błony związanej z mitochondriami (ang. *mitochondria-associated membranes*, MAM) białka niezbędne do przeprowadzenia tych procesów (Friedman i in. 2011, Elgass i in. 2013). Na przykład wykazano oddziaływanie MAM z białkiem DRP1, tworzącym zacieśniający się pierścień na mitochondrium, powodując jego podział (Friedman i in. 2011).

Do utworzonego autofagosomu, zawierającego uszkodzone mitochondria, przyłącza się lizosom zawierający różne enzymy hydrolityczne. Białko membrany lizosomu (ang. *lysosome associated membrane protein 1*, LAMP1) i LAMP2 uczestniczą w procesie połączenia autofagosomu z lizosomem (Eskelinen i in. 2006). Pozbawienie myszy białka LAMP2 w sercu spowodowało zahamowanie autofagii i nagromadzenie autofagosomów, co prowadziło do aktywacji genów apoptozy i przerostu kardiomiocytów, zwłóknienia i spadku funkcji skurczowej serca (Alcalai i in. 2021). Brak LAMP1 nie wpłynął na morfologię, aktywność i liczbę lizosomów, co prawdopodobnie było związane z kompensacyjnym wzrostem zawartości LAMP2 (Andrejewski i in. 1999), natomiast nadekspresja *Lamp1* w szczurzych kardiomiocytach stymulowała proliferację, hamowała apoptozę i produkcję ROS oraz poziom markerów uszkodzenia serca (Song i in. 2022).

3.4. Wpływ jonów Ca²⁺ na funkcje i metabolizm serca

Jony Ca²⁺ odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu serca, ponieważ poprzez oddziaływanie z troponiną, biorą udział w przemieszczaniu się filamentów miozynowych względem filamentów aktynowych, co wywołuje skurcz kardiomiocytów (Eisner i in. 2020). W momencie stymulacji skurczu dochodzi do napływu Ca²⁺ do wnętrza komórki powodując stymulowany wapniem wyrzut wapnia (ang. calcium-induced calcium release, CICR) z ER przez kanał RyR. Uwolnione Ca^{2+} wiaża się z troponina, co powoduje kurczenie się kardiomiocytu (Eisner i in. 2020). Brak RyR jest letalny dla mysich embrionów w związku z zaburzonym rozwojem serca, nabrzmieniem (ang. swelling) ER oraz mitochondriów (Takeshima i in. 1998), podczas gdy zwiększony poziom RyR w warunkach nadczynności tarczycy był powiązany z przerostem serca (Jiang i in. 2000). Po zakończonym skurczu, mięsień sercowy musi się rozluźnić w celu ponownego napełnienia krwią, a więc Ca²⁺ muszą ponownie trafić do ER, za co odpowiada SERCA2 (Eisner i in. 2020). Fosfolamban (ang. phospholamban, PLN) jest białkiem hamującym aktywność SERCA2, jednak w formie ufosforylowanej, np. przez PKA lub CaMKII, ta interakcja jest zniesiona (Mattiazzi i Kranias 2014). Indukowane obniżenie ekspresji genu kodującego SERCA2 spowodowało spadek funkcji skurczowej i rozkurczowej serca, a także częstości uderzeń serca i umiarkowane zwłóknienie, bez zmian w strukturze serca. Ponadto, siła skurczu kardiomiocytów in vitro była obniżona, a czas rozluźnienia wydłużony (Louch i in. 2010). Nadekspresja Pln wywołała podobny efekt, tj. spadek funkcji skurczowej, jak również wydłużony czas wychwytu Ca²⁺ przez ER (Kadambi i in. 1996). Natomiast usunięcie PLN skutkowało skróceniem czasu skurczu i rozkurczu serca oraz zwiększeniem ciśnienia skurczowego (Luo i in. 1994). Zwiększona zawartość Ca²⁺ w cytozolu w wyniku zaburzonego ich wychwytu przez ER, prowadziła do przeciążenia mitochondriów Ca²⁺, co skutkowało zwiększoną przepuszczalnością IMM, zaburzonym potencjałem mitochondriów, spadkiem produkcji ATP, a wzrostem ROS, a w konsekwencji rozwojem HF (Zhou i Tian 2018).

Oprócz wymienionych efektów w funkcjonowaniu kardiomiocytów, Ca2+ wpływaja również na metabolizm. Wykazano, że szlak lipolizy może być aktywowany przez Ca²⁺, które pośrednicza w stymulacji tego procesu przez izoprenaline (Dhalla i in. 1977, Schwartz i in. 1993, Zangenberg i in. 2001). Mechanizm, przez jaki Ca²⁺ wpływają na aktywność lipolizy, obejmuje aktywację AC, która stymuluje kinazę PKA poprzez zwiększenie poziomu cAMP (Schwartz i in. 1996, Chen i in. 2011). PKA fosforyluje szereg białek bioracych udział w lipolizie, co prowadzi do zwiększonej aktywności wspomnianego procesu (Pagnon i in. 2012, Cerk i in. 2018). Ponadto Ca²⁺ wpływają na tempo lipogenezy poprzez zwiększenie ekspresji Fas w adipocytach (Zemel 2003), a w mieśniach zwiekszaja wrażliwość na insuline poprzez aktywację AMPK (Funai i in. 2013). Myszy z mutacją receptora Ca²⁺, która hamuje przenikanie jonów do wnętrza komórki, charakteryzowały się zmniejszonym tempem utleniania FAs na skutek zmniejszonej zawartości CD36 w błonie komórkowej i mitochondrialnej (Georgiou i in. 2015). Ponadto Ca²⁺ mogą regulować aktywność syntazy ATP, jednak ich nadmiar w mitochondriach może powodować dysfunkcję wspomnianych organelli poprzez zmniejszoną powierzchnię grzebieni mitochondrialnych, zwiększenie przepuszczalności IMM, zaburzenie potencjału membranowego, zwiększoną produkcję ROS i obniżoną produkcję ATP (Lai i Qui 2020).

3.5. Przebudowa i dysfunkcja serca towarzyszące otyłości

Otyłość jest elementem złożonej choroby określanej syndromem metabolicznym, w skład której dodatkowo wchodzą takie zaburzenia jak: hiperglikemia, insulinooporność, nadciśnienie i dyslipidemia (Alberti i in. 2009). Dominującym czynnikiem wywołującym otyłość jest nadmierna ilość spożywanych kalorii w stosunku do zapotrzebowania organizmu (Vandevijvere i in. 2015), a dwoma głównymi zagrożeniami jakie ze sobą niesie jest zwiększone ryzyko rozwoju T2D i CVD (Alberti i in. 2009). Pacjenci z syndromem metabolicznym mają dwukrotnie wyższe prawdopodobieństwo rozwoju CVD w ciągu najbliższych 10 lat, a T2D pięciokrotnie wyższe (Alberti i in. 2009). Średnio w Europie, jak i w Polsce, 23 % populacji jest otyła (Raport WHO, 2022). Otyli pacjenci rozwijają HF z zachowaną frakcją wyrzutową (ang. *heart failure with preserved ejection fraction*, HFpEF), czyli z zaburzoną funkcją rozkurczową serca, a współwystępowanie T2D zwiększa ryzyko śmierci pacjentów z HFpEF o 30-50 % (Mgbemena i in. 2021).

Zwiększona ilość tkanki tłuszczowej w organizmie oddziałuje na układ sercowonaczyniowy na dwóch płaszczyznach. Pierwsza z nich hemodynamiczna, wiąże się ze wzrostem objętości krwi w organizmie i pojemności minutowej serca (ang. *cardiac output*, CO) spowodowanymi zwiększonymi wymaganiami energetycznymi organizmu, co przekłada się na większe obciążenie tego narządu i wymusza na nim przebudowę w celu zaspokojenia zwiększonego zapotrzebowania na dostarczenie krwi (de Simone i in. 1994, Ebong i in. 2014). U pacjentów z otyłością stwierdzono koncentryczny przerost serca, czyli wzrost grubości ścian z jednoczesnym spadkiem objętości lewej komory serca (Neeland i in. 2013). Drugi poziom, niezależny od hemodynamiki, oddziałuje przez stres oksydacyjny, dyslipidemię,

insulinooporność, podwyższony poziom cytokin prozapalnych i aktywację systemu reninaangiotensyna-aldosteron (de Simone i in. 1994, Ebong i in. 2014, Kruszewska i in. 2022). Wymienione czynniki powodują usztywnienie (ang. stiffness) ścian naczyń krwionośnych, przede wszystkim aorty, rozwój nadciśnienia i wzrost ciśnienia napływu krwi do serca w czasie rozkurczu, które prowadzą do jego przeciążenia (ang. pressure overload) i HFpEF (Jia i in. 2016, Sorimachi i in. 2021). Otyłość powoduje również przerost kardiomiocytów, stłuszczenie i zwłóknienie serca będące wynikiem zaburzeń w regulacji macierzy pozakomórkowej, apoptozy lub przerostu kardiomiocytów (Rabkin i in. 2007, Kruszewska i in. 2022). Struktura i ilość macierzy pozakomórkowej, odpowiadającej za przenoszenie siły skurczu kardiomiocytów, jest zaburzona w warunkach otyłości przez zmiany w aktywności enzymów ją modelujących, co przekłada się na nadmierną akumulację kolagenu, prowadząc do zwiększenia sztywności ścian serca (Eid i in. 2019, Kruszewska i in. 2022). W mysich (Wang i in. 2012) i szczurzych (Czarzasta i in. 2018, Jiménez-González i in. 2020) modelach wykazano rozwój zwłóknienia serca w warunkach otyłości wywołanej długoterminowym spożywaniem HFD. Wyższa zawartość lipidów w sercu prowadzi do rozwoju lipotoksyczności, czyli nadmiernej aktywacji szlaków lipidowych w wyniku nagromadzenia metabolitów lipidowych, stresu i dysfunkcji organelli, m.in. ER i mitochondriów, wywołując deficyt energetyczny i apoptozę (Schulze i in. 2016). Kolejnym efektem lipotoksyczności jest spadek wrażliwości serca na insuline, co obniża wykorzystanie glukozy jako substratu energetycznego przez serce i przesuwa metabolizm serca w kierunku większego wychwytu, magazynowania i utleniania FAs (D'Souza i in. 2016). Wymienione czynniki prowadzą do nadmiernego polegania serca na jednym źródle energii, tj. FAs, i utraty tzw. "elastyczności metabolicznej" (ang. metabolic flexibility), czyli zdolności wykorzystania różnych źródeł energii w zależności od dostępności, wymagań energetycznych czy poziomu hormonów (Karwi i in. 2018). Wysokie tempo utleniania FAs zwiększa ilość produkowanych ROS, powodując stres oksydacyjny i uszkodzenie mitochondriów (Atici i in. 2023). Wymienione czynniki prowadzą do spadku funkcji rozkurczowej serca, tj. zaburzonego i wydłużonego w czasie napływu krwi do wnętrza lewej komory serca, w związku ze zwiększoną sztywnością ścian serca, będącej cechą charakterystyczną dla HFpEF (Mgbemena i in. 2021).

Mechanizm, przez jaki otyłość wywołuje ww. negatywne efekty, rozpoczyna się od zwiększonego poziomu lipidów w kardiomiocytach (Christoffersen i in. 2003, Nakamura i Sadoshima 2020 Lu i in. 2021, Xu i in. 2022). Wysoka dostępność FAs aktywuje czynniki transkrypcyjne, np. PPARα, które stymulują ekspresję genów odpowiedzialnych za transport i utlenianie FAs, magazynowanie i obieg (ang. *turnover*) TG, zawartość ceramidów i DAG w kardiomiocytach (Schulze i in. 2016). W sercach otyłych myszy pozbawionych receptora leptyny (db/db) (Carley i in. 2007) i szczurów z rozwiniętą T2D (Luiken i in. 2001) stwierdzono wyższy poziom CD36 i zawartość TG. Kardiomiocyty wspomnianych szczurów w warunkach *in vitro* miały zwiększony transport FAs, poziom zmagazynowanych TG i upośledzone kurczenie się (Luiken i in. 2001). Efekt ten został odwrócony przez zahamowanie CD36 (Angin i in. 2012). Samo magazynowanie TG jest uważane za proces ochronny przed lipotoksycznością SFA (Listenberger i in. 2003), niemniej zwiększony poziom TG wskazuje na zwiększoną zawartość innych frakcji lipidowych powodujących lipotoksyczność, np. ceramidów i DAG (Rijzewijk i in. 2008, Drosatos i Schulze 2013).

SFA wywołują lipotoksyczność w kardiomiocytach poprzez usztywnianie błon (Hac-Wydro i Wydro 2007), mniejszą podatność SFA na utlenianie i estryfikację (DeLany i in. 2000) oraz obniżenie pojemności oksydacyjnej mitochondriów (Neubauer 2007, Chen i in. 2023a). Kolejnym negatywnym efektem otyłości jest zwiększone tempo utleniania FAs w kardiomiocytach w celu pokrycia deficytu energetycznego. Zwiększona dostępność FAs, m.in. przez aktywację PPARa, aktywuje utlenianie FAs i jednocześnie hamuje wykorzystanie glukozy (cykl Randle'a), co zwiększa ilość produkowanych w mitochondriach ROS (Boudina i in. 2007). Wywołane przez ROS stres oksydacyjny ER i apoptoza są efektem spadku kontroli jakości i dysfunkcji mitochondriów, prowadząc do rozprzegnięcia procesu glikolizy i utleniania glukozy oraz deficytu energetycznego, a w konsekwencji do HF (Neubauer 2007, Fillmore i in. 2014, Shao i in. 2020). Serca otyłych myszy db/db oraz ob/ob miały obniżone tempo utleniania glukozy, a zwiększone wykorzystanie FAs z jednoczesnym spadkiem wydajności kurczenia się (Buchanan i in. 2005). Pomimo że w warunkach otyłości najcześciej dochodzi do zwiekszonego tempa utleniania FAs w sercu, to jednak sam ten proces nie jest odpowiedzialny za opisane efekty. Wykazano, że wyższa aktywność utleniania FAs wywołana usunięciem ACC2 spowodowała zachowanie funkcji serca, czemu towarzyszyła poprawa kontroli jakości mitochondriów (Kolwicz i in. 2012, Liu Z i in. 2020, Shao i in. 2020). Kolejno wyższa zawartość ceramidów i DAG w sercu, towarzysząca otyłości, powoduje spadek wrażliwości na insulinę tego narządu, co przyczynia się do pogłębienia zaburzeń w związku ze spadkiem dostępności glukozy do utleniania (D'Souza i in. 2016). Wysoka dostępność FAs w komórce i wysokie tempo ich utleniania wiążą się z aktywacją transportu FAs do mitochondriów postaci acylokarnityny. Nadmierne kierowanie FAs do utleniania, w związku W z przeciążeniem mitochondriów, prowadzi do zwiększonej zawartości acylokarnityny w komórce, która również wywołuje lipotoksyczność w warunkach otyłości w zwiazku z zaburzeniem struktury sarkolemy i funkcji elektrofizjologicznych (Ford i in. 1996, Su i in. 2005). Badania z ostatnich lat wykazują, że głównym czynnikiem prowadzącym do HF w warunkach otyłości jest dysfunkcja mitochondriów, m.in. rozprzegnięcie łańcucha oksydacji fosforylacyjnej, prowadząca do zwiększonego "przeciekania elektronów" i produkcji ROS (Boudina i in. 2007), spadku pojemności oksydacyjnej (Neubauer 2007, Chen i in. 2023b), spadku ilości produkowanego ATP (Atici i in. 2023) oraz zaburzeń dynamiki i kontroli jakości mitochondriów (Tong i in. 2019).

Podsumowując, u otyłych osobników w związku z wyższą dostępnością FAs dochodzi do zwiększonego transportu i magazynowania lipidów oraz SFA w kardiomiocytach. Większa zawartość SFA w komórce powoduje wiele negatywnych efektów na poziomie molekularnym, m.in. dysfunkcję mitochondriów, w związku z zaburzoną płynnością błon i zahamowaną mitofagią, co prowadzi do zwiększonej produkcji ROS, stresu ER i apoptozy. Spadek wydajności produkcji ATP w mitochondriach uniemożliwia prawidłowe funkcjonowanie kardiomiocytów, a rejony serca, w których doszło do apoptozy ulegają zwłóknieniu, co razem przekłada się na spadek wydolności serca objawiający się wydłużeniem czasu napływu krwi do lewej komory serca, co jest cechą charakterystyczną HFpEF.

4. Założenia i cele pracy

Nadmierna ilość spożywanych kalorii w stosunku do zapotrzebowania organizmu prowadzi do nagromadzenia lipidów w organizmie i do otyłości, co jest przyczyną rozwoju T2D oraz CVD. Zwiększona ilość tkanki tłuszczowej w organizmie oddziałuje na układ sercowo-naczyniowy przez zwiększony stres oksydacyjny, dyslipidemię, insulinooporność i podwyższony poziom cytokin prozapalnych. Nagromadzenie szkodliwych metabolitów lipidowych w kardiomiocytach prowadzi do rozwoju lipotoksyczności, co wiąże się z aktywacją lub zahamowaniem szlaków sygnałowych, powodując dysfunkcję organelli, wywołując deficyt energetyczny i apoptozę. Kolejnym efektem lipotoksyczności jest spadek wrażliwości serca na insulinę, co obniża wykorzystanie glukozy jako substratu energetycznego i przesuwa metabolizm serca w kierunku większego wychwytu, magazynowania i utleniania FAs. Wysokie tempo utleniania FAs zwiększa ilość produkowanych ROS powodując stres oksydacyjny, uszkodzenie mitochondriów i zaburzenie homeostazy jonów Ca²⁺.

SCD jest jednym z głównych enzymów zaangażowanych w regulację metabolizmu lipidów w kardiomiocytach. Brak ekspresji Scd1 obniżył aktywność PPARa i zawartość PUFA w kardiomiocytach, co skutkowało niższym tempem utleniania FAs w sercu. Poziom białek zaangażowanych w wychwyt FAs i lipogenezę również był obniżony przez wyciszenie Scd1, a szybkość lipolizy zwiększona, co skutkowało mniejszym stłuszczeniem serca. U otyłych myszy ob/ob, usunięcie SCD1 poprawiło skurczową i rozkurczową funkcję serca poprzez zmniejszenie apoptozy kardiomiocytów. Brak SCD1 zwiększał natomiast aktywność kompleksów mitochondrialnych I, II i III w adipocytach, podczas gdy nadekspresja Scd1 w kardiomiocytach hamowała indukowaną przez SFA syntezę ROS w mitochondriach i apoptozę. Karmienie myszy dietą HFD zmniejszyło także mitochondrialną produkcję ATP i potencjał błony mitochondrialnej, co przyczyniło się do dysfunkcji serca. Rola SCD4, która jest uważana za izoformę specyficzną dla serca, w regulacji metabolizmu jest natomiast słabo poznana. Wykazano, że wyciszenie Scd4 w sercu myszy zmniejszyło aktywację AMPK, która była indukowana przez MI. Brak ekspresji Scd4 w mięśniu sercowym po zawale zmniejszał także powstawanie ROS poprzez obniżenie poziomu białka podjednostek oksydazy NADPH. Utrata SCD4 obniżała również poziom czynników proangiogennych w sercu i osoczu, co sugeruje, że SCD4 pozytywnie reguluje tworzenie naczyń krwionośnych w mięśniu sercowym myszy po MI.

W związku z powyższym, głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było określenie wpływu wyciszenia ekspresji *Scd4* na strukturę, funkcję i metabolizm serca w stanie fizjologicznym oraz w otyłości.

Szczegółowe cele badawcze:

- 1. Określenie roli SCD4 w regulacji ogólnoustrojowego metabolizmu myszy;
- 2. Zbadanie wpływu wyciszenia *Scd4* na funkcję i strukturę serca w warunkach fizjologicznych i w otyłości;
- Identyfikacja szlaków metabolicznych, przez które SCD4 reguluje metabolizm lipidów w sercu, ze szczególnym uwzględnieniem lipogenezy, lipolizy i β-oksydacji;
- 4. Określenie wpływu ekspresji *Scd4* na strukturę i aktywność mitochondriów w kardiomiocytach.

5. Materiały i metody

5.1. Modele in vivo

W celu określenia roli, jaką SCD4 pełni w sercu, a także jej wpływu na cały organizm w rozwoju otyłości, w badaniach wykorzystano model myszy C57BL/6 z zahamowaną ekspresją (ang. *knock-out*) genu *Scd4* w całym organizmie (SCD4^{-/-}). Grupę kontrolną stanowiły myszy typu dzikiego (ang. *wild type*, WT). Zwierzęta pochodziły z hodowli w Zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie. Myszy SCD4^{-/-} zostały opisane przez Gan i wsp. w publikacji naukowej w 2022 roku (Gan i in. 2022). W skrócie, trzeci egzon genu *Scd4* został usunięty metodą Cre-LoxP, a brak obecności mRNA potwierdzony metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitive polymerase chain reaction*, qPCR) z wykorzystaniem starterów w obrębie egzonu czwartego i piątego. Do doświadczeń wykorzystano samce w wieku piętnastu tygodni. Zwierzęta rozmnażane były przez krzyżowanie homozygotycznych SCD4^{-/-} samic i samców. Fenotyp myszy SCD4^{-/-} nie różnił się od fenotypu myszy WT.

Zwierzęta przez okres ośmiu tygodni były karmione standardową paszą laboratoryjną (ang. *chow diet*; dlatego w dalszej części pracy myszy te będą określane jako "WT chow" i "SCD4^{-/-} chow") (Sniff V1124) – 9 % kalorii z tłuszczu lub paszą HFD – 60 % kalorii z tłuszczu (Sniff E15742), w celu wywołania otyłości (w dalszej części pracy grupy te będą określane jako "WT HFD" i "SCD4^{-/-} HFD"). W trakcie eksperymentu zwierzęta miały nieograniczony dostęp do pokarmu i wody, przebywały w klimatyzowanych pomieszczeniach, gdzie panowała temperatura 22 ± 2 °C i wilgotność powietrza 55 %. Rytm dobowy regulowany był automatycznie. Ilość spożywanej karmy monitorowana była co dwa dni, natomiast masa ciała zwierząt raz w tygodniu.

Po zakończonym eksperymencie, myszy w wieku dwudziestu trzech tygodni były uśmiercane przez dyslokację rdzenia kręgowego. Następnie pobierano krew i ścianę lewej komory serca, które natychmiast były mrożone w ciekłym azocie i przechowywane w stanie głębokiego zamrożenia w temperaturze –80 °C. U części osobników z każdej grupy badanej fragment tkanki serca był przeznaczony do obrazowania mikroskopowego, co zostało szczegółowo opisane w kolejnych częściach tego rozdziału.

Przeprowadzone eksperymenty z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych, zostały zaaprobowane przez I Lokalną Komisję Etyczną do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (Uchwała LKE 6/2015).

5.1.1. Badanie echokardiograficzne

W trakcie ósmego tygodnia eksperymentu zwierzęta zostały poddane badaniu echokardiograficznemu. Myszy uśpiono poprzez inhalację 1,5 % izofluranem. Do obrazowania użyto ultrasonografu VisualSonics model Vevo 2100 wyposażonego w głowicę MS550S o częstotliwości 32-56 MHz. Do analizy wyników użyto programu Vevo LAB 3.2.6 (FUJIFILM VisualSonics).

Wykonano przymostkowe obrazowanie 1-wymiarowe "M-mode" lewej komory serca w krótkiej osi serca na poziomie występowania mięśni brodawkowatych (Ryc. 8). Posłużyło ono do określenia grubości przedniej (ang. *anterior wall thickness*, AWT) i tylnej (ang. posterior wall thickness, PWT) ściany lewej komory mięśnia sercowego, wymiaru końcoworozkurczowego lewej komory (ang. end-diastolic diameter, EDD) i wymiaru końcowoskurczowego lewej komory (ang. end-systole diameter, ESD). Względną grubość ściany lewej komory serca (ang. relative wall thickness, RWT) wyrażono jako stosunek podwojonej wartości PWT do EDD (RWT = $2 \times PWT/EDD$). Objętość końcoworozkuczową lewej komory serca (ang. end-diastole volume, EDV) i objętość końcowoskurczową lewej komory serca (ang. end-diastole volume, EDV) i objętość końcowoskurczową lewej komory serca (ang. end-systole volume, ESV) wyliczono na podstawie EDD i ESD odpowiednio, przy założeniu elipsoidalnego kształtu jamy lewej komory serca (EDD = $1,047 \times EDD^3/1000$; ESV = $1,047 \times ESD^3/1000$) (Devereux i Reichek 1976, Stolzmann i in. 2008). Do określenia frakcji wyrzutowej (ang. ejection fraction, EF) użyto wzoru EF = (EDV–ESV)/EDV. Objętość wyrzutową (ang. stroke volume, SV) wyliczono według wzoru SV = EDV–ESV, a wyniku SV użyto do wyliczenia pojemności minutowej (ang. cardiac output, CO) jako iloczyn SV i częstości uderzeń serca (ang. heart rate, HR) (CO = SV×HR).



Ryc. 8. Przykładowe zdjęcie echokardiogramu lewej komory w krótkiej osi serca. AWTd, końcoworozkurczowa grubość przedniej ściany lewej komory serca; AWTs, końcowoskurczowa grubość przedniej ściany lewej komory serca; EDD, końcoworozkurczowa średnica wewnętrzna lewej komory serca; ESD, końcowoskurczowa średnica wewnętrzna lewej komory serca; PWTd, końcoworozkurczowa grubość tylnej ściany lewej komory serca; PWTs końcowoskurczowa grubość tylnej ściany lewej komory serca.

5.1.2. Dootrzewnowy test tolerancji glukozy

W ósmym tygodniu trwania eksperymentu przeprowadzono dootrzewnowy test tolerancji glukozy. Myszy głodzono przez 12 godz., po czym zmierzono wyjściowy poziom glukozy we krwi. Następnie zwierzętom dootrzewnowo podano roztwór glukozy, w dawce 2 g na kilogram masy ciała. Po 15, 30, 60, 90 i 120 minutach od podania glukozy wykonano kolejne pomiary poziomu glukozy we krwi. W teście wykorzystano glukometr Optium Xido.

5.1.3. Pomiar długości kości piszczelowej

Długość kości piszczelowej jest używana do określenia rozmiaru myszy, w celu wyeliminowania zmian np. w masie ciała spowodowanych zaburzonym rozwojem. Po zakończonym eksperymencie zmierzono długość kości piszczelowej od stawu kolanowego do stawu skokowego, przy użyciu suwmiarki cyfrowej.

5.1.4. Pobranie krwi

Krew pobrano przez nakłucie lewej komory serca igłą 25GA ze strzykawką 1 ml do probówek zawierających 50 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 i delikatnie mieszano. Następnie krew wirowano przez 10 min w 4 °C przy 5000×g. Osocze, tworzące górną warstwę nadsączu, przeniesiono do probówek typu eppendorf, mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia w temperaturze –80 °C.

5.1.5. Pobranie ściany lewej komory serca

Serce wycinano z klatki piersiowej, ważono i umieszczano na bloku chłodzącym. Następnie wycinano ścianę lewej komory serca usuwając przedsionki serca, zastawki i ścianę prawej komory serca. Tkankę mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia w temperaturze –80 °C.

5.1.6. Analiza składników osocza

Do zbadania poziomu glukozy, TG i cholesterolu w osoczu użyto komercyjnych zestawów BioSystems (numery katalogowe 11503, 11528, 11505, odpowiednio). W skrócie 2 µl osocza lub standardu (glukoza o stężeniu 100 mg/dl, TG o stężeniu 200 mg/dl, cholesterol o stężeniu 200 mg/dL) dodawano do 200 µl mieszaniny zawierającej enzymy przeprowadzające reakcje (dla glukozy: oksydaza glukozowa; dla TG: lipaza, kinaza glicerolowa, oksydaza glicerolo-3-fosforanowa; dla cholesterolu: esteraza cholesterolowa, oksydaza cholesterolowa). Próbki dokładnie mieszano i inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zmierzono absorbancję prób badanych i standardów wobec próby ślepej przy długości fali 500 nm przy użyciu czytnika płytek TECAN (model Infinite M200 PRO).

Do zbadania poziomu wolnych kwasów tłuszczowych (ang. *free fatty acids*, FFA) w osoczu użyto zestawu odczynników NEFA-HR(2) (Wako Chemicals). W skrócie do 150 µl odczynnika zawierającego syntetazę acyl-CoA dodawano 3,5 µl osocza lub standardu (kwas oleinowy o stężeniu 28,2 mg/dL). Próbki mieszano, inkubowano 2 min w temperaturze 37 °C, po czym wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 546 nm będący próbą ślepą. Następnie w 3. min do prób dodano oksydazę acyl-CoA, wymieszano i inkubowano w 37 °C. W 7. min 30. sek. zmierzono ponownie absorbancję.

Stężenie insuliny oznaczono za pomocą komercyjnego zestawu Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Millipore, EZRMI-13K) według instrukcji producenta. W skrócie, do dołków 96dołkowej płytki powlekanych przeciwciałem anty-insulina dodano 10 µl osocza lub standardu, 10 µl buforu reakcyjnego oraz 80 µl przeciwciała anty-insulina sprzężonego z biotyną. Po dwugodzinnej inkubacji dołki płukano trzykrotnie, po czym dodano 100 µl roztworu peroksydazy chrzanowej (*ang. horseradish heroxidase*, HRP) sprzężonej ze streptawidyną i inkubowano 30 min. Dołki ponownie płukano, a następnie dodano 100 µl roztworu 3,3',5,5'tetrametylobenzydyny (TMB) i inkubowano 15 min. Po tym czasie dodano 100 µl buforu zatrzymującego reakcję i po 2 min zmierzono absorbancję fal o długościach 450 nm i 590 nm, wobec próby ślepej. Wszystkie inkubacje przeprowadzono w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem.

5.1.7. Obliczenie współczynnika insulinooporności (HOMA-IR)

Współczynnik oszacowania stopnia insulinooporności (ang. *homeostatic model assessment of insulin resistance*, HOMA-IR) obliczono na podstawie stężenia glukozy oraz insuliny na czczo, korzystając ze wzoru HOMA-IR = [stężenie insuliny (mU/L) × stężenie glukozy (mM)]/22,5 (Matthews i in., 1985).

5.2. Modele in vitro

5.2.1. Hodowla komórek HL-1

W eksperymentach użyto komórki HL-1, które otrzymano od prof. Williama C. Claycomba z Louisiana State University Medical Center, Nowy Orlean, USA. Linia komórkowa została wyprowadzona z komórek kardiomiocytów AT-1 pozyskanych z guzów przedsionka serca myszy. Komórki HL-1 posiadają fenotyp dorosłych kardiomiocytów, mogą być wielokrotnie pasażowane i posiadają nieograniczoną żywotność, co umożliwia ich ciągłą hodowlę. W określonych warunkach komórki te posiadają zdolność do kurczenia się (Claycomb i in. 1998).

Hodowlę prowadzono w przeznaczonej dla HL-1 pożywce Claycomb Medium (Sigma, 51800C), która była wzbogacona w inaktywowaną termicznie 10 % płodową surowicę bydlęcą (ang. *fetal bovine serum*, FBS), antybiotyki (penicylinę 100 U/ml, streptomycynę 100 µg/ml), 2 mM L-glutaminę i 0,1 mM norepinefrynę. Komórki hodowano w sterylnych, plastikowych butelkach 25 cm² lub na płytkach 96-, 24- lub 6-dołkowych (DB Falcon), które uprzednio traktowano roztworem fibronektyny o stężeniu 5 mg/L w 0,02 % wodnym roztworze żelatyny. Komórki hodowano w temperaturze 37 °C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającą 5 % CO₂. Pożywkę zmieniano co 24 godz. Komórki pasażowano dwa razy w tygodniu przy konfluencji 90 %.

5.2.2. Wyciszenie ekspresji genu Scd4 w komórkach HL-1

Wyciszenie ekspresji genu *Scd4* w komórkach HL-1 przeprowadzono metodą transfekcji. Komórki hodowano w standardowej pożywce przeznaczonej dla linii komórkowej HL-1 (jak opisano w rozdziale 5.2.1) do czasu uzyskania konfluencji na poziomie 50 %. Wówczas przeprowadzano transfekcję z wykorzystaniem mieszaniny czterech krótkich interferujących sekwencji RNA (ang. *small interfeting RNA*, siRNA) specyficznych dla genu *Scd4* (siSCD4) (Dharmacon, L-064703-01). Jako kontroli negatywnej użyto mieszaniny czterech sekwencji siRNA nieposiadających sekwencji docelowych w genomie myszy (Dharmacon, D-001810-01) (non-targ). Wyciszenie przeprowadzano z użyciem mieszaniny transfekcyjnej składającej się z siRNA o stężeniu końcowym w pożywce 30 nM i mieszaniny odczynnika jetPRIME z przeznaczonym dla niego buforem (Polyplus, 101000046; 1:33, v/v). Po 10 min inkubacji w temperaturze pokojowej, mieszaninę transfekcyjną dodawano do pożywki hodowlanej (1:10, v/v) pozbawionej antybiotyków i norepinefryny. Po 24 godz. pożywka była zmieniana na standardową pożywkę hodowlaną. Komórki hodowano kolejne 24 godz., a następnie oceniano poziom wyciszenia genu *Scd4* metodą qPCR (Ryc. 9). Na chwilę obecną nie istnieje przeciwciało specyficzne dla białka SCD4.

Materiały i metody



Ryc. 9. Ekspresja genu *Scd4* w komórkach HL-1 po wyciszeniu jego ekspresji przy użyciu transfekcji siRNA. Poziom mRNA genu *Scd4* w komórkach kontrolnych (non-targ) oraz komórkach transfekowanych mieszaniną siRNA specyficznych dla *Scd4* (siSCD4). Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm SD, n = 3 niezależne powtórzenia eksperymentu, *p < 0,05 siSCD4 vs grupa kontrolna (non-targ).

5.2.3. Nadekspresja genu Scd4 w komórkach HL-1

Przejściową wzmożoną ekspresję genu *Scd4* w komórkach HL-1 uzyskiwano w wyniku transfekcji wektorem plazmidowym pCMV6-Entry (Origene, PS100001) zawierającym sekwencję kodującą białko SCD4 połączoną ze znacznikiem Myc-Tag (pSCD4). Protokół syntezy wektora został opisany w rozdziale 5.3. Kontrolę stanowiły komórki transfekowane plazmidem pustym, bez wstawki (pCMV6). Komórki HL-1 hodowano w standardowej pożywce (jak opisano w rozdziale 5.2.1) do czasu uzyskania konfluencji na poziomie 75-80 %. Następnie przeprowadzano transfekcję z wykorzystaniem mieszaniny transfekcyjnej składającej się z plazmidu pSCD4 lub pCMV6 o stężeniu końcowym w pożywce 1 μg/ml i mieszaniny odczynnika jetPRIME z przeznaczonym dla niego buforem (1:50, v/v). Po 10 min inkubacji w temperaturze pokojowej, mieszaninę transfekcyjną dodawano do pożywki hodowlanej (1:10, v/v) pozbawionej antybiotyków i norepinefryny. Po 6 godz. pożywka była zmieniana na standardową pożywkę hodowlaną. Komórki hodowano kolejne 42 godz., a następnie oceniano poziom ekspresji genu *Scd4* metodą qPCR oraz Western Blot (Ryc. 10).



Ryc. 10. (A) poziom mRNA genu *Scd4* oraz (B) reprezentatywny immunoblot przedstawiający zawartość rekombinowanego białka SCD4 ze znacznikiem Myc-Tag. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm SD, n = 3 niezależne powtórzenia eksperymentu, *p < 0,05 pSCD4 vs grupa kontrolna (pCMV6).

5.2.4. Traktowanie komórek HL-1 kwasem stearynowym

W celu stymulacji magazynowania lipidów przez komórki HL-1, inkubowano je przez 16 godz. z 0,1 mM kwasem stearynowym (18:0) połączonym z albuminą surowicy bydlęcej (ang. *bovine serum albumin*, BSA) pozbawioną FAs. Kompleks przygotowywano poprzez zmydlenie 18:0 w 0,1 M wodorotlenku sodu (NaOH) do jego soli sodowej w temperaturze 70 °C. Następnie do roztworu dodano 10 % BSA i mieszano przez 1 godz. w temperaturze 55 °C

(Sinha i in. 2004). Tak utworzony kompleks 18:0 z BSA o stężeniu 25 mM filtrowano przez filtr strzykawkowy o porach wielkości 0,45 μ m, porcjowano i zamrażano w –20 °C.

5.2.5. Analiza przeżywalności komórek

Przeżywalność komórek HL-1 określano z użyciem odczynnika CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega, G8080) zgodnie z instrukcją producenta. Odsetek żywych komórek szacowano na podstawie ich aktywności metabolicznej, polegającej na zdolności do redukcji rezazuryny (barwa niebieska) do rezorufiny (barwa różowa). Liczba komórek żywych jest wprost proporcjonalna do intensywności różowego zabarwienia. Komórki inkubowano w pożywce pełnej zawierającej odczynnik CellTiter-Blue (1:10, v/v) przez 2 godz., a następnie mierzono absorbancję fali o długości 570 nm oraz fali referencyjnej o długości 600 nm za pomocą czytnika płytek TECAN (model Infinite M200 PRO). Przeżywalność komórek określano na podstawie wartości absorbancji fali badanej pomniejszonej o wartość absorbancji fali referencyjnej, z uwzględnieniem próby ślepej. Dla próby kontrolnej przyjęto wartość 100 % i do niej odnoszono wartości uzyskane dla prób badanych.

5.2.6. Ocena przeżywalności komórek HL-1 traktowanych kwasem stearynowym

W celu zbadania żywotności komórek HL-1 w obecności 18:0, przeprowadzono eksperyment, w którym do pożywki Claycomb o obniżonej z 10 % do 1 % zawartości FBS dodawano 18:0 w stężeniach od 0 mM (BSA) do 1 mM. Następnie tak przygotowaną pożywkę dodawano do komórek HL-1 o konfluencji 80 % i inkubowano przez 16 godz. Uzyskane wyniki wykazały, że 16-godzinna inkubacja komórek HL-1 z 18:0 w stężeniu poniżej 0,2 mM włącznie nie powodowała istotnego spadku przeżywalności (Ryc. 11). Stężenie 0,1 mM było wykorzystywane w dalszych eksperymentach i powodowało akumulację lipidów, potwierdzoną barwieniem czerwienią oleistą (Oil Red O) (Ryc. 12).



Ryc. 11. Wpływ kwasu stearynowego (18:0) w różnych stężeniach na przeżywalność komórek HL-1. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm SD, n = 3 niezależne powtórzenia eksperymentu, *p < 0,05 vs grupa kontrolna (BSA).



Ryc. 12. Zdjęcia mikroskopowe komórek HL-1 inkubowanych z 0,1 mM kwasem stearynowym (18:0) lub albuminą (BSA) jako kontrolą, przez 16 godz. Zakumulowane lipidy w postaci okrągłych kropli lipidowych (żółte strzałki) mają barwę ciemnoczerwoną.

5.3. Konstrukcja wektora pSCD4

5.3.1. Uzyskanie insertu i wektora do klonowania

W celu uzyskania fragmentu DNA kodującego (ang. *coding DNA sequence*, CDS) *Scd4* oraz pustego wektora, strawiono plazmidy pSCD4-AC-GFP (Origene, MG215310) oraz pCMV6-Entry, odpowiednio. Reakcję przeprowadzono z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych MluI i BamHI (ThermoFisher Scientific, ER0561 i ER0051, odpowiednio), w następujących warunkach:

011 1	•	•	1		•
Skład	mies	zanınv	rea	kcv1ne1	1:
~				, j	

Bufor R $2 \mu l$ BamHI $1 \mu l$ MluI $1 \mu l$ wektor $2 \mu g$ H₂Odo 20 μl

Protokół reakcji: 1. 37 °C 3 godz. 2. 80 °C 20 min 3. 4 °C

Produkty przeprowadzonej reakcji zostały rozdzielone elektroforetycznie w 1,5 % żelu agarozowym, prążki migrujące na wysokości odpowiadającej teoretycznemu rozmiarowi insertu (1096 pz) oraz liniowemu wektorowi (4844 pz) zostały wycięte z żelu, a następnie oczyszczone przy użyciu zestawu Gel-Out Concentrator (A&A Biotechnology, 023-50C) według instrukcji producenta. Aby zapobiec recyrkularyzacji wektora, poddano go traktowaniu fosfatazą (Thermo Scientific, EF0651). Tak uzyskany materiał przechowywano w 4 °C do czasu dalszych analiz.

5.3.2. Ligacja

Ligację, uzyskanego w sposób opisany powyżej, insertu *Scd4* oraz wektora pCMV6-Entry przeprowadzono z ligazą T4 DNA (Thermo Scientific, EL0011), w następujących warunkach:

Skład mieszaniny reak	cyjnej:
Bufor ligazy T4	2 µl
Ligaza T4	0,5 µl
insert Scd4	77 ng
wektor pCMV6-entry	70 ng
H ₂ O	do 20 µl

Protokół reakcji: 1. 22 °C 2 godz. 2. 70 °C 5 min 3. 4 °C Otrzymany wektor pCMV6-Entry z inertem *Scd4* (pSCD4) wykorzystano do dalszych analiz.

5.3.3. Przygotowanie podłoża do hodowli bakterii

Płynną pożywkę (LB) do hodowli bakterii *Escherichia coli* przygotowano przez rozpuszczenie 10 g peptonu, 5 g ekstraktu drożdżowego i 10 g NaCl w 1000 ml wody dejonizowanej. W celu uzyskania stałej pożywki (LA) do 100 ml LB dodano 1,4 g agar-agar i autoklawowano. Do ostudzonej do 50 °C, płynnej LA dodano kanamycynę o stężeniu końcowym 25 μg/ml i wylano na plastikowe szalki (Falcon, 353003). Po zestaleniu i ostudzeniu do temperatury pokojowej, szalki z LA były przechowywane w 4 °C do czasu dalszych analiz.

5.3.4. Transformacja bakterii

W celu namnożenia plazmidu przeprowadzono transformację bakterii chemokompetentnych *E. coli* DH5 α . Do 50 µl bakterii dodano 0,1 ng plazmidu i inkubowano 30 min na lodzie. Następnie bakterie umieszczano na 40 sek. w 42 °C, po czym dodano 1 ml buforu SOC (2% pepton, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukoza) i inkubowano z wytrząsaniem w 37 °C przez 1 godz. Bakterie wirowano 5 min 5000×g, a osad zawieszany w 50 µl LB wysiewano na szalki z podłożem selekcyjnym (LA + 25 µg/ml kanamycyna). Bakterie inkubowano przez 16 godz. w 37 °C. Po tym czasie wybrane pojedyncze kolonie przesiewano na nowe szalki z podłożem selekcyjnym i inkubowano 16 godz. w 37 °C.

5.3.5. Izolacja plazmidu

Przesiane, pojedyncze kolonie bakterii przenoszono do 5 ml LB z 25 µg/ml kanamycyną i inkubowano z wytrząsaniem w 37 °C przez 3-4 godz., a następnie zaszczepiano 100 µl ww. hodowli do 100 ml LB z 25 µg/ml kanamycyną i inkubowano z wytrząsaniem w 37 °C przez 16 godz. Po tym czasie, plazmid izolowano przy użyciu zestawu Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology, 092-10) według instrukcji producenta.

5.4. Analiza zawartości białek metodą Western Blot

5.4.1. Homogenizacja ściany lewej komory serca

20 mg ściany lewej komory serca homogenizowano w 200 μ l buforu homogenizacyjnego (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 2 mM EGTA; 2 mM EDTA, 2 mM Na₃VO₄; 1 mM PMSF; 10 mM β -merkaptoetanol; 5 μ g/ml pepstatyna A, 10 μ g/ml leupeptyna; 1,4 μ g/ml aprotynina) za pomocą urządzenia Tissue Lyser II (Qiagen), 2×30 sek., 20 Hz w temperaturze 4 °C. Następnie homogenaty wirowano przez 10 min przy 3000×g w 4 °C. Supernatant pobierano do nowej probówki i oznaczano w nim stężenie białka (jak opisano w rozdziale 5.4.3).

5.4.2. Liza komórek HL-1

Komórki HL-1 płukano jednokrotnie buforem PBS o temperaturze 37 °C i zbierano poprzez tzw. "trypsynizację" (inkubacja z roztworem trypsyny 5 min w 37 °C, a następnie dodanie pożywki pełnej w celu inaktywacji trypsyny), wirowano (5 min, 500×g, 21 °C),

zawieszano w buforowanym fosforanem roztworze soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline*, PBS) o temperaturze 4 °C i ponownie wirowano 5 min przy 500×g w 4 °C. Osad komórkowy zawieszano w buforze lizującym (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM Na₃VO₄; 0,1 mM PMSF; 1 mM DTT; 1 % Triton X-100; 5 µg/ml pepstatyna A, 10 µg/ml leupeptyna; 1,4 µg/ml aprotynina) i poddano działaniu ultradźwięków w łaźni wodnej (Diagenode, Bioruptor Standard) w trzech cyklach (ustawienia: HIGH, 60 sek. ON; 90 sek. OFF). Następnie lizaty wirowano przez 10 min przy 10 000×g w 4 °C. Supernatant pobierano do nowej probówki i oznaczano w nim stężenie białka (jak opisano w rozdziale 5.4.3)

5.4.3. Pomiar stężenia białka

Stężenie białka w homogenatach i lizatach, po uprzednim rozcieńczeniu wodą dejonizowaną (1:9, v/v) oznaczano za pomocą komercyjnego zestawu DC Protein Assay (Bio-Rad, 5000112) według instrukcji producenta. Do dołków płytki 96-dołkowej dodawano 5 μl roztworu białek prób badanych lub rozcieńczeń standardów, 25 μl odczynnika A, 200 μl odczynnika B i mieszano przez 5 sek. Po 15 min inkubacji w temperaturze pokojowej, mierzono absorbancję fali o długości 750 nm używając czytnika płytek TECAN (model Infinite M200 PRO) wobec próby ślepej. Zawartość białka obliczano na podstawie przygotowanej krzywej wzorcowej, wyznaczonej na podstawie absorbancji standardów o znanej ilości BSA.

5.4.4. Elektroforetyczny rozdział białek w warunkach denaturujących (SDS/PAGE)

Elektroforetyczny rozdział białek prowadzono w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Laemmli, 1970), stosując 10 % żel rozdzielający (10 % akrylamid/bis-akrylamid; 625 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,15 mM SDS, 0,04 % APS, 0,05 % TEMED) i 5 % żel zagęszczający (5 % akrylamid/bis-akrylamid; 625 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,15 mM SDS; 0,04% APS; 0,1% TEMED). Próby przygotowywano do elektroforezy dodając do homogenatów/lizatów pięciokrotnie stężony bufor obciążający (10 % SDS; 50 % glicerol; 325 mM Tris; 10 % β -merkaptoetanol; 0,05 % błękit bromofenolowy) i inkubując przez 10 min w 65 °C. Na żele poliakrylamidowe nanoszono próby w objętości odpowiadającej od 20 do 50 µg białka. Rozdział elektroforetyczny prowadzono w aparacie Mini-PROTEAN Tetra cel (Bio-Rad, 1658000) przy stałym napięciu 70 V przez pierwsze 15 min, a następnie 100 V przez 90 min, w układzie dwóch buforów: katodowy (0,1 M Tris; 0,1 M trycyna; 0,1 % SDS) i anodowy (0,2 M Tris-HCl pH 8,9). Do oszacowania masy molekularnej białek podlegających rozdziałowi elektroforetycznemu użyto wzorca wielkości białek PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, 26619) obejmującego zakres od 10 kDa do 250 kDa.

5.4.5. Transfer elektroforetyczny oraz detekcja białek

Po rozdziale elektroforetycznym białka przenoszono z żelu poliakrylamidowego na membranę z polifluorku winylidenu (ang. *polyvinylidene difluoride*, PVDF; Millipore) metodą transferu mokrego w aparacie Criterion Blotter (Bio-Rad, 1656024), w buforze transferowym (25 mM Tris; 192 mM glicyna, 10 % metanol), przy stałym natężeniu 250 mA przez 16 godz., w 4 °C. Skuteczność transferu białek oceniano na podstawie barwienia czerwienią Ponceau (0,2 % Ponceau S; 1 % kwas octowy). Aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu przeciwciał, membrany inkubowano w 5 % roztworze odtłuszczonego mleka w proszku w buforze TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween-20) – tzw. "blokowanie" membrany. Membranę płukano trzykrotnie przez 10 min w buforze TBS-T, po czym inkubowano przez 16 godz. w 4 °C w roztworze przeciwciał I-rzędowych skierowanych przeciwko badanemu białku, w buforze TBS-T zawierającym 3 % BSA. Listę przeciwciał I-rzędowych zaprezentowano w Tabeli 2. Dalej membranę płukano trzykrotnie przez 10 min w buforze TBS-T, po czym inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciał II-rzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową, w buforze TBS-T zawierającym 2,5 % odtłuszczone mleko w proszku. Listę przeciwciał II-rzędowych przedstawiono na końcu Tabeli 2. Membranę płukano trzykrotnie przez 10 min w buforze TBS-T, a następnie przeprowadzano detekcję białek za pomocą odczynników do chemiluminescencji SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34578). Membranę umieszczano w kasecie razem z kliszą rentgenowską (Fuji), po czym kliszę wywoływano w wywoływarce Fujifilm FPM 800A. Po tak przeprowadzonej detekcji, kliszę skanowano i poddawano analizie densytometrycznej za pomocą programu ImageJ.

Przeciwciała I-rzędowe					
Nazwa przeciwciała	Masa białka (kDA)	Gospodarz	Użyte rozcieńczenie	Dostawca	
anty-ABHD5 (CGI-58)	39	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-ACC	275	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling	
anty-AKT1	60	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling	
anty-AMPK	63	królik	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-AS160	160	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling	
anty-ATGL	54	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling	
anty-β-aktyna sprzężone z HRP	42	_	1:50 000 (2,5 % mleko)	Sigma-Aldrich	
anty-CaMKII	50	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-CD36	88	mysz	1:100 (1 % BSA)	Santa Cruz	
anty-Col1a2	80	koza	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-CPTI	86	koza	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-DGAT2	44	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-FAS	270	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-G0S2	11	królik	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-GAPDH	37	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling	
anty-GLUT4	50	królik	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-GPAT1	94	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-HSL	81, 83	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling	
anty-KEAP1	69	koza	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz	
anty-kinaza PI3 p110α	110	królik	1:1000 (3% BSA)	Cell Signaling	
anty-LAMP1	120	mysz	1:1000 (3% BSA)	Santa Cruz	
anty-LC3B	16	królik	1:5000 (2,5 % mleko)	Sigma	
anty-Myc-tag		królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling	

Tabela 2. Lista przeciwciał wykorzystanych w analizach Western Blot.

anty-NRF1	68	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-OXPHOS koktail:	_					
anty-NDUFB8	22					
anty-SDHB	28		1.5000 (2.0) DCA)	A 1		
anty-UQCRC2	48	mysz	1:5000 (3 % BSA)	Adcam		
anty-MTCO1	40					
anty-ATP5A	55					
anty-p62	62	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-pACC	275	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-pAKT1 Ser473	60	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-pAKT1 Thr308	60	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-pAMPK	62	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-pAS160	160	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-Parkin	55	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Abcam		
anty-PGC-1a	92	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-pHSL Ser563	81, 83	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-pHSL Ser565	81, 83	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-PKA	40	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-PLN	6, 25	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-PPARa	55	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-RyR	565	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Abcam		
anty-SCD1	37	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-SERCA2a	110	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-SREBP1c	68, 125	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-TFAM	25	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
anty-UCP3	33	królik	1:1000 (3 % BSA)	Cell Signaling		
anty-VLCAD	70	mysz	1:1000 (3 % BSA)	Santa Cruz		
Przeciwciała II-rzędowe						
anty-królicze sprzężone z HRP	_	koza	1:10 000 (2,5 % mleko)	MP Biomedicals		
anty-mysie sprzężone z HRP	_	koza	1:15 000 (2,5 % mleko)	Jackson ImmunoResearch Laboratories		
anty-mysie IgG sprzężone z Alexa Fluor 488	_	osioł	1:400 (1% BSA)	Life Technologies		

5.5. Analiza zawartości lipidów

5.5.1. Ekstrakcja lipidów

Lipidy ekstrahowano mieszaniną chloroformu i metanolu według metody opisanej przez Bligh i Dyer (1959). Komórki HL-1 trzykrotnie płukano buforem PBS o temperaturze 37 °C, zbierano przez "trypsynizację" (5 min, 37 °C), wirowano (5 min, 500×g, 21 °C), a następnie zawieszano w PBS o temperaturze 4 °C i ponownie wirowano (5 min, 500×g, 4 °C). Dalej osad komórek lub 40 mg tkanki lewej komory serca homogenizowano w 1 ml mieszaniny

chloroformu i metanolu (2:1, v/v) z 0,01 % butylowanym hydroksytoluenem (ang. *butylated hydroxytoluene*, BHT) przez 1 min na lodzie, używając homogenizatora nożowego (VWR, VDI12). Następnie dodawano 0,5 ml wody dejonizowanej i wytrząsano przez 20 sek., po czym wirowano przez 10 min, 1700×g, 4 °C. Po zwirowaniu pobierano dolną, chloroformową fazę zawierającą lipidy i używano do dalszych analiz.

5.5.2. Rozdział lipidów obojętnych z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej

Otrzymane po ekstrakcji lipidy rozdzielano metodą chromatografii cienkowarstwowej (ang. thin layer chromatography, TLC) na szklanych płytkach chromatograficznych o wymiarach 20×20 cm, pokrytych 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego (Merck-Millipore, 105721). 1,5 cm od dolnej krawędzi płytki nanoszono lipidy prób badanych, w ilości odpowiadającej 1 mg białka z komórek HL-1 lub 15 mg tkanki serca (45 mg dla prób poddawanych analizie z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, GC-MS). Rozdział lipidów obojętnych przeprowadzano w szklanej komorze wysyconej oparami mieszaniny heptan/eter izopropylowy/kwas octowy (60:40:3, v/v/v), której ściany wyściełano bibułą 3CHR (Whatman). Rozdział chromatograficzny prowadzono do momentu osiągnięcia przez czoło mieszaniny rozpuszczalników wysokości 0,5 cm od górnej krawędzi płytki. Dalej płytkę zanurzano w 10 % roztworze CuSO₄ przygotowanym w 8 % H₃PO₄, a następnie wypalano przez 30 min w 140 °C, w celu wizualizacji lipidów. Poszczególne frakcje lipidowe, tj. fosfolipidy (ang. phospholipids, PL), DAG, cholesterol, FFA, TG, CE identyfikowano na podstawie współczynnika retencji Rf wzorców (Rf = droga wzorca/droga czoła fazy). Zawartość lipidów analizowano densytometrycznie za pomoca programu ImageJ. Dla prób poddanych analizie GC-MS, płytkę po rozdziale chromatograficznym spryskano 0,2 % roztworem dichlorofluoresceiny w metanolu i umieszczono w komorze z oparami amoniaku na 10 min. Poszczególne frakcje lipidowe wizualizowano w świetle UV (Dobrzyn i Gorski, 2002).

5.5.3. Analiza kwasów tłuszczowych z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS)

Skład jakościowy i ilościowy FAs analizowano metodą chromatografii gazowej (Dobrzyn i in. 2005). Rozdzielone frakcje lipidów obojętnych tj. DAG, cholesterol, FFA, TG i CE zeskrobano z żelem krzemionkowym z płytki chromatograficznej i przeniesiono do zakręcanych szklanych probówek. Do każdej próby dodano 100 µl kwasu nonadekanowego (C19:0) jako standardu wewnętrznego i 2 ml mieszaniny chloroformu i metanolu (4:1, v/v) z 0,01 % BHT. Ekstrakcję lipidów z żelu krzemionkowego prowadzono przez 16 godz. Po tym czasie nadsącz przenoszono do nowej szklanej zakręcanej probówki i odparowano mieszaninę rozpuszczalników w strumieniu azotu. Dalej do prób dodano 1 ml 14 % roztworu trifluorku boru, a następnie poddano metylacji w 100 °C przez 10 min dla frakcji DAG, FFA, CE i cholesteolu oraz 30 min dla frakcji TG. Następnie do schłodzonych do temperatury pokojowej prób dodano 2 ml heksanu i wytrząsano przez 20 sek. Kolejno dodano 1 ml wody dejonizowanej, wytrząsano przez 20 sek. i wirowano przez 10 min, przy 1700×g. Górną warstwę zawierającą estry metylowe FAs rozpuszczone w heksanie przenoszono do nowych

probówek i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Próby rozpuszczono w 100 µl heksanu i poddano rozdziałowi przy użyciu chromatografu gazowego.

Estry metylowe FAs w próbach identyfikowano i oznaczano ilościowo przy użyciu chromatografu gazowego Agilent Technologies 7890A sprzężonego ze spektrometrem masowym Agilent Technologies 5975. Próby były nastrzykiwane na kolumnę automatycznie przez autosampler Agilent Technologies 7683B. Do rozdziału wykorzystano kolumnę kapilarną HP-5 MS (Agilent Technologies) o długości 30 m. Jako gazu nośnego użyto hel. Oznaczenie prowadzono przy stałej temperaturze 260 °C detektora oraz zmiennej temperaturze kolumny kapilarnej (pieca): start przy 50 °C, wzrost do 200 °C w tempie 10 °C/min i utrzymanie temperatury przez 10 min, wzrost temperatury do 220 °C w tempie 10 °C/min i jej utrzymanie przez 30 min. FAs identyfikowano na podstawie czasów retencji wzorców Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma, 47885-U) oraz widm spektrum jonów charakterystycznych dla poszczególnych FAs, korzystając z biblioteki National Institute of Standards and Technology. Widma analizowano i przeliczano na podstawie krzywych wzorcowych przy użyciu programu MSD ChemStation Data Analysis. W Tabeli 3 została przedstawiona lista analizowanych FAs.

Zwyczajowa nazwa kwasu	Systematyczna nazwa kwasu	Symbol				
Nasycone kwasy tłuszczowe						
mirystynowy	tetradekanowy	C14:0				
palmitynowy	heksadekanowy	C16:0				
stearynowy	oktadekanowy	C18:0				
arachidowy	eikozanowy	C20:0				
behenowy	dokozanowy	C22:0				
lignocerynowy	tetrakozanowy	C24:0				
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe						
palmitooileinowy	cis-9-heksadekaenowy	C16:1 Δ^9				
oleinowy	cis-9-heksadekaenowy	C18:1Δ ⁹				
cis-wakcenowy	cis-11-oktadekaenowy	C18:1Δ ¹¹				
gondolowy	cis-11-eikozenowy	C20:1Δ ¹¹				
erukowy	cis-13-dokozenowy	C22:1 Δ^{13}				
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe						
linolowy	cis-9,12-oktadekadienowy	C18:2 $\Delta^{9,12}$				
_	cis-11,14-eikozadienowy	$C20:2\Delta^{11,14}$				
dihomo-y-linolenowy	cis-8,11,14-eikozatrienowy	20:3 ^{8,11,14}				

1 and 3 . Lista ananzo wany ch 1 1	Tabela	3.	Lista	analizowanych	FAs.
---	--------	----	-------	---------------	------

Materiały i metody

arachidonowy	cis-5,8,11,14-eikozatetraenowy	C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$
eikozapentaenowy (EPA)	cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenowy	$C20:5\Delta^{5,8,11,14,17}$
dokozaheksaenowy (DHA)	cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenowy	C22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$

5.6. Analiza poziomu mRNA

5.6.1. Izolacja RNA i synteza cDNA

Izolację całkowitego RNA z komórek i ściany lewej komory serca przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Total RNA Mini Plus (A&A Biotechnology, 036-100), według instrukcji producenta. W tym celu: (1) fragment (ok. 25 mg) tkanki lewej komory serca homogenizowano w odczynniku Fenozol Plus przy pomocy urządzenia Tissue Lyser II (Qiagen), 2×30 sek., 20 Hz w temperaturze 4 °C; (2) komórki HL-1 zeskrobywano z naczynia hodowlanego w odczynniku Fenozol Plus na lodzie i mieszano przez pipetowanie w celu lizy komórek. Stężenie otrzymanego RNA oznaczano przy fali o długości 260 nm na urządzeniu NanoPhotometer N50 Touch (Implen). Wartość stosunku absorbancji fali o długości 260 nm do fali o długości 280 nm (260/280) dla badanych prób zawierała się w zakresie 1,8-2,1.

W celu usunięcia pozostałości genomowego DNA, próby poddano trawieniu DNazą (Thermo Scientific, EN0521) w następujących warunkach:

Skład mieszaniny	reakcyjnej:	Prot	okół real	ccji:
RNA	1 μg	1.	37 °C	30 min
DNaza	1 U	2.	4 °C	
bufor do DNazy	1 μl			
H ₂ O	do 9 µl			

W celu inaktywacji enzymu dodano 1 µl EDTA w stężeniu końcowym 5 mM i inkubowano przez 10 min w 65 °C. Dalej RNA przepisywano na cDNA z użyciem zestawu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, K1632) w następujących warunkach:

Skład mieszaniny reakcyjnej:		Prot	okół reał	ceji:
1 μg RNA po trawieniu DNazą	10 µl	1.	65 °C	5 min
$0,5 \ \mu g/\mu l \ oligo(dT)_{18}$	1 µl	2.	4 °C	
H ₂ O	1 µl			
Po czym do mieszaniny reak	cyjnej dodano:			
10 mM dNTP	2 µl	1.	42 °C	60 min
20 U/µl inhibitor rybonukleaz	1 µl	2.	70 °C	5 min
5x bufor	4 µl	3.	4 °C	
200 U/µl odwrotna transkryptaza	1 µl			

Do prób stanowiących kontrolę negatywną reakcji odwrotnej transkrypcji zamiast enzymu dodano wodę wolną od RNaz.

5.6.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Analizę poziomu mRNA genów na matrycy cDNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725272) w następujących warunkach:

Skład mieszaniny reakcyjnej:		Protokół reakcji:
SYBR Green Supermix	5 µl	1. 95 °C 30 sek
starter przedni 6 µM	0,5 µl	2. 95 °C 15 sek
starter wsteczny 6 µM 0,5 µl		3. 60 °C 30 sek
cDNA	15-50 μg	4. 39-krotne powtórzenie cykli 2. i 3
H ₂ O do 10 μl		5. wzrost temperatury o 0,5 °C co
		2 sek. do osiągnięcia 95 °C

Jako kontroli negatywnej użyto próby pozbawionej matrycy cDNA. Sekwencje starterów wykorzystanych w reakcjach przedstawiono w Tabeli 4.

Nazwa genu	Sekwencja startera przedniego	Sekwencja startera wstecznego
Scd1	TACCGCTGGCACATCAACTTC	AACAGGAACTCAGAAGCCCAAAGC
Scd2	CACTGGGGAGCAGATGTTCG	CAAATACGCGAAGAGACAGGTG
Scd4	GTTCCAGAGGAGGTACTACAAG	GAGACGCATAAGCTGTGTTG
Rpl32	AGTTCCTGGTCCACAATGTCA	GCACACAAGCCATCTACTCATT
Nppa	TATACAGTGCGGTGTCCAACA	AGAGCCCTCAGTTTGCTTTTC
Nppb	TTTGGGCTGTAACGCACTGA	TTGTGGCAAGTTTGTGCTCC
Myh6	GGCACAGAAACACCTGAAGA	CATTGGCATGGACAGCATCATC
Myh7	ATGTGCCGGACCTTGGAA	CCTCGGGTTAGCTGAGAGATCA
Ndufv2	TGGATGGCTACCTATCTCCGCT	GGTACTTCCCAACTGGCTTTCG

Tabela 4. Lista starterów użytych do analiz ekspresji genów metodą qPCR.

5.6.3. Analiza poziomu mRNA metodą bezpośredniej detekcji ekspresji genów

Analizę aktywności szlaków metabolicznych przeprowadzono metodą nCounter (NanoString Technologies). Skorzystano z gotowego panelu 748 genów zaangażowanych w 36 szlaków i procesów metabolicznych (Mouse Metabolic Pathways Panel) (Tabela 5). Metoda polega na bezpośredniej detekcji natywnego RNA przez znakowane fluorescencyjnie sondy posiadające sekwencję komplementarną do RNA badanych genów. Po hybrydyzacji i związaniu do specjalnego podłoża przy użyciu urządzenia nCounter Prep Station, utworzone kompleksy RNA-sonda są skanowane przez czytnik fluorescencyjny (nCounter Digital Analyzer), identyfikowane na podstawie indywidualnych znaczników i liczone. Uzyskany wynik przedstawia liczbę kopii RNA danego genu.

Materiał RNA wyizolowano z lewej komory serca, jak opisano w rozdziale 5.6.1, a następnie do analizy przesłano 300 ng RNA o stężeniu 25 ng/µl w stanie zamrożenia –20 °C. Korzystając z oprogramowania nSolver 4.0, na podstawie wyników kontroli negatywnych, z otrzymanych wyników usunięto sygnał pochodzący z tła, a wyniki prób badanych znormalizowano względem kontroli pozytywnych. Obliczone w ten sposób znormalizowane liczby powtórzeń danego genu (ang. *normalized counts*, NC) wykorzystano do analizy zróżnicowanej ekspresji (ang. *differentia expression*, DE). Poziom zmiany ekspresji danego genu (ang. *fold change*, FC) obliczono jako stosunek log₂ uśrednionej wartości NC próby badanej do próby kontrolnej.

Nazwa szlaku/procesu	Liczba badanych genów	Nazwa szlaku/procesu	Liczba badanych genów
Aktywność IDH1/2	15	Odzysk nukleotydów	23
АМРК	48	PI3K	85
Autofagia	54	Prezentacja antygenu	44
Cykl komórkowy	68	Regulacja epigenetyczna	26
Degradacja w lizosomach	16	Regulacja transkrypcji	53
Endocytoza	41	Synteza aminokwasów	92
Glikoliza	38	Synteza FAs	13
МАРК	53	Synteza nukletydów	53
Metabolizm argininy	16	Szlak KEAP1/NRF2	7
Metabolizm glutaminy	34	Szlak p53	38
Metabolizm tryptofanu i kinureniny	33	Szlak pentozofosforanowy	19
Metabolizm witamin i kofaktorów	28	Szlak sygnałowy cytokin i chemokin	126
mTOR	57	Szlak sygnałowy TCR i współtowarzyszące	55
Мус	20	Szlak sygnałowy TLR	32
Naprawa uszkodzeń DNA	31	Transport aminokwasów	15
NF-ĸB	27	Transport glukozy	5
Niedotlenienie (Hipoksja)	15	Utlenianie FAs	21
Oddychanie mitochondrialne	75	Kontrola wewnętrzna	20
Odpowiedź na ROS	43		

Tabela 5. Lista szlaków i procesów metabolicznych zawartych w panelu Mouse Metabolic Pathways Panel analizowanych metodą nCounter (NanoString Technologies).

5.7. Barwienie lipidów obojętnych w komórkach HL-1 i ekstrakcja barwnika

Komórki HL-1 płukano trzykrotnie buforem PBS o temperaturze 37 °C, po czym utrwalano przez 15 min w 4 % wodnym roztworze formaldehydu (ang. *paraformaldehyde*, PFA). Następnie utrwalone komórki płukano dwukrotnie wodą dejonizowaną, jednokrotnie 60 % izopropanolem przez 5 min i barwiono przez 10 min świeżo przygotowanym roztworem czerwieni oleistej (Oil Red O) (0,4 % roztwór Oil Red O w mieszaninie izopropanol:woda

dejonizowana (3:2, v/v)). Po tym czasie barwnik usuwano, komórki płukano pięciokrotnie przez 1 min wodą dejonizowaną. Utrwalone komórki z zabarwionymi lipidami obojętnymi obserwowano przy użyciu odwróconego mikroskopu świetlnego (Olympus, CKX410).

W celu określenia poziomu akumulacji lipidów obojętnych, po zarchiwizowaniu zdjęć komórek HL-1 poddanych barwieniu, zaabsorbowany barwnik ekstrahowano czystym izopropanolem przez 30 min. Następnie zabarwiony izopropanol przeniesiono do dołków płytki 96-dołkowej i zmierzono absorbancję fali o długości 518 nm. Jako kontroli negatywnej użyto komórek nie barwionych Oil Red O.

5.8. Pomiar aktywności ATGL

Pomiar tempa lipolizy przeprowadzono z pewnymi zmianami według metody opisanej przez Iglesias i wsp. (2016). Metoda polega na pomiarze przyrostu emisji fluorescencji barwnika EnzChek (Invitrogen, E33955), będącego analogiem TG, w wyniku hydrolizy wiązania estrowego przez lipazę ATGL. Glicerol, będący rdzeniem cząsteczki EnzChek, posiada związany w pozycji sn-1 fluorofor BODIPY, który pozostaje wygaszony przez cząsteczkę czerwieni metylowej związanej w pozycji sn-2 do czasu, gdy obie cząsteczki są związane z glicerolem. W momencie, gdy jedna z cząsteczek zostaje odłączona od rdzenia w wyniku hydrolizy, dochodzi do emisji fali o długości 520 nm wzbudzanej falą o długości 485 nm.

Komórki HL-1 płukano trzykrotnie buforem PBS o temperaturze 37 °C, a następnie dodawano bufor A (100 mM NaCl; 50 mM HEPES; 0,5 mM DTT; 2 % DMSO; 0,1 % Triton X-100; pH 7,2) o temperaturze 4 °C, płytkę umieszczano na lodzie i komórki zdrapywano. 20 mg ściany lewej komory serca homogenizowano za pomocą urządzenia Tissue Lyser II (Qiagen), 2×20 sek., 15 Hz w buforze A o temperaturze 4 °C. Lizaty i homogenaty wirowano 500×g, 5 min, w 4 °C, pobrano supernatant i zmierzono stężenie białka. Następnie w płytce 96-dołkowej umieszczonej na lodzie przygotowano mieszaninę reakcyjną: próba badana w ilości odpowiadającej 30 µg białka, EnzChek o stężeniu końcowym 1 µM, bufor A uzupełniony do objętości 100 µl. Dalej płytkę umieszczono w ogrzanym uprzednio do temperatury 37 °C czytniku płytek TECAN (model Infinite M200 PRO) i uruchamiano pomiar o następujących parametrach: 485/520 nm długość fali wzbudzającej/emitowanej; gain: 100; wytrząsanie 2 sek., step: 60 sek.; czas trwania pomiaru: 90 min. Wyniki pomiaru przedstawiano na wykresie jako funkcję wartości fluorescencji zależną od czasu. Do wyznaczenia współczynnika nachylenia krzywej do osi x, będącego miarą tempa reakcji, wykorzystano prostoliniowy odcinek krzywej.

5.9. Barwienia histochemiczne

5.9.1. Pobranie serca i przygotowanie skrawków parafinowych

Serce wycinano z klatki piersiowej i umieszczano w PBS o temperaturze 4 °C, celem usunięcia pozostałej w tkance krwi. Dalsze etapy przygotowania tkanki były przeprowadzone we współpracy z Pracownią Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie. Tkankę umieszczano kolejno w 7 % i 10 % wodnym roztworze PFA, a następnie odwadniano w rosnących stężeniach etanolu począwszy od 50 %, przez 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, do 99,8% oraz w czystym ksylenie. Preparat umieszczano w ciekłej parafinie na noc, po

czym zatapiano w bloczku parafinowym. Tkankę cięto wzdłuż krótkiej osi serca, na wysokości mięśni brodawkowatych na skrawki o grubości 6 µm i umieszczano na szkiełkach podstawowych.

5.9.2. Odparafinowanie i uwodnienie skrawków

Preparaty na szkiełkach podstawowych odparafinowano i uwodniono poprzez kolejne płukania trwające 3 min każde, w następujących roztworach: ksylen, ksylen:etanol (1:1, v/v), 99,8 % etanol, 95 % etanol, 70 % etanol, 50 % etanol. Na końcu preparat umieszczano w wodzie destylowanej na 10 min.

5.9.3. Barwienie z zastosowaniem hematoksyliny i eozyny (H&E)

Barwienie H&E służy do oceny struktury tkanki, dzięki zabarwieniu cytoplazmy na różowo (eozyna) i jąder komórkowych na fioletowo (hematyksylina). Uwodnione preparaty barwiono przez 1 min w hematoksylinie Mayera (Sigma, MHS32), a nadmiar barwnika wypłukano w bieżącej wodzie. Następnie skrawki barwiono przez 1 min w eozynie Y (Sigma, HT110116) i powtórnie wypłukano w bieżącej wodzie. Pomiaru powierzchni kardiomiocytów dokonano przy użyciu narzędzi w oprogramowaniu ImageJ.

5.9.4. Barwienie z zastosowaniem czerwieni Syriusza

Barwienie roztworem czerwieni Syriusza służy do wizualizacji włókien kolagenowych (barwa czerwona) i cytoplazmy (barwa żółta) w tkance. Uwodnione preparaty barwiono przez 1 godz. w roztworze czerwieni Syriusza, a następnie wypłukano dwukrotnie przez 1 min w 0,5 % roztworze kwasu octowego. Pomiaru powierzchni tkanki zabarwionej na czerwono dokonano przy użyciu narzędzi oprogramowania ImageJ.

5.9.5. Odwodnienie skrawków

Po wykonanych barwieniach H&E i czerwienią Syriusza skrawki odwodniono poprzez kolejne płukania trwające 2 min każde w następujących roztworach: 50 % etanol, 70 % etanol, 95 % etanol, 99,8 % etanol, ksylen:etanol (1:1, v/v), ksylen. Następnie na preparaty nakrapiano odczynnik do zaklejania preparatów mikroskopowych (Leica, 14046430011) i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty zostały zwizualizowane i zarchiwizowane przy użyciu mikroskopu Olympus BX41 oraz oprogramowania CellSens Dimension v1.14.

5.9.6. Przygotowanie skrawków mrożeniowych

Dla skrawania techniką mrożeniową, tkankę zatapiano w 30 % roztworze sacharozy, a następnie w mieszaninie OCT (ang. *optimal cutting temperature compound*). Skrawki tkanki cięte wzdłuż krótkiej osi serca grubości 10 µm umieszczano na szkiełkach podstawowych i przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia w temperaturze –80 °C do czasu dalszych analiz.

5.9.7. Barwienie ROS

Do barwienia ROS użyto dihydroetydyny (DHE). Skrawki mrożeniowe płukano 30 sek. w wodzie dejonizowanej, a następnie umieszczano w 5 µM wodnym roztworze DHE na 15 min, bez dostępu światła. Następnie preparaty płukano trzykrotnie przez 1 min w wodzie dejonizowanej i natychmiast wizualizowano używając światła o długości fali 490 nm do

wzbudzenia emisji fali 590 nm. Intensywność fluorescencji mierzono używając narzędzi programu ImageJ.

5.9.8. Barwienie zależne od aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy NADH

W celu zmierzenia aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy NADH (kompleks I) wykonano barwienie z wykorzystaniem błękitu nitrotetrazolowego, w którym intensywność koloru zależy od aktywności wspomnianego enzymu. Skrawki mrożeniowe płukano trzykrotnie przez 1 min buforem PBS, po czym barwiono 1,5 mM roztworem błękitu nitrotetrazolowego, w obecności NADH w stężeniu 0,625 mg/ml w 0,1 M PBS, o pH 7,0 przez 40 min. Następnie preparaty płukano trzykrotnie przez 1 min buforem PBS i odwodniono, jak zostało to opisane w rozdziale 5.9.5. Średnią intensywność zabarwienia (Iśrednie) oraz maksymalną intensywność (Imax) mierzono przy użyciu programu ImageJ, jak zostało to opisane w dostępnej literaturze (Varghese i in. 2014, Schneider i in. 2012). Aktywność dehydrogenazy NADH obliczano jako pochodną log10(Imax/Iśrednie).

5.10. Barwienie immunofluorescencyjne skrawków parafinowych serc

Preparaty parafinowe gotowano przez 20 min w buforze cytrynianowym (10 mM cytrynian sodu, 0,05 % Tween-20, pH 6,0) w 100 °C, studzono przez 30 min do temperatury pokojowej, po czym płukano dwukrotnie przez 2 min w PBS-T (PBS z 0,05 % Tween-20) i inkubowano przez 1 godz. w 1 % roztworze BSA w PBS-T. Po zakończonym "blokowaniu" niespecyficznych miejsc wiązania, preparaty inkubowano przez noc w 4 °C z przeciwciałem anty-CD36 w 1 % roztworze BSA w PBS-T. Następnie skrawki płukano pięciokrotnie przez 2 min w PBS-T i inkubowano z II-rzędowym przeciwciałem Alexa Fluor 488 przez 2 godz. w ciemności. Lista użytych przeciwciał znajduje się w Tabeli 2. Po trzykrotnym płukaniu przez 5 min w PBS-T, przeprowadzono redukcję sygnału autofluorescencji tkanki przy użyciu komercyjnego zestawu, według instrukcji producenta (Invitrogen, R37630). Dalej, preparaty inkubowano przez 5 min w roztworze DAPI (1:5000), ponownie płukano PBS-T, a następnie zamykano używając preparatu Fluorescent Mounting Medium (Dako) i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Obrazy mikroskopowe uzyskano przy użyciu mikroskopu skanującego Olympus (Slide Scanner VS110) i poddano je analizie intensywności fluorescencji w programie ImageJ.

5.11. Mikroskopia elektronowa

Do obrazowania ultrastruktur komórkowych (sarkomerów, mitochondriów, LDs) wykorzystano metody mikroskopii elektronowej, we współpracy z Pracownią Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN w Warszawie. W skrócie, fragment tkanki pochodzący z wolnej ściany lewej komory serca na wysokości mięśni brodawkowatych utrwalono w 1 % roztworze tlenku osmu, odwodniono w etanolu, a następnie barwiono 1 % roztworem octanu uranu w 70 % etanolu. Tkankę inkubowano w mieszaninie etanol/glikol propylenowy (1:1, v/v), następnie w czystym tlenku propylenu i zatopiono w żywicy epoksydowej. Skrawki tkanki serca umieszczano na siateczce i barwiono octanem uranu i cytrynianem ołowiu. Mikrograf elektronowy uzyskano przy użyciu kamery Morada na

transmisyjnym mikroskopie elektronowym (ang. *transmission electron microscopy*, TEM) JEM 1400 przy 80 kV (JEOL Co., Japan).

5.12. Analiza statystyczna

Istotność statystyczną otrzymanych wyników oceniono, używając programu GraphPad Prism z zastosowaniem dwuskładnikowej analizy wariancji (Two-Way ANOVA), popartej testem post hoc Holm-Šídák. W przypadku porównań jednokrotnych dwóch grup eksperymentalnych stosowano test t-Studenta. Uzyskane wyniki przedstawiano jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*, SD). Liczebność populacji (N) zwierząt wykorzystanych w eksperymencie wynosiła N = 47, poszczególne liczebności prób (n) dla eksperymentów *in vivo* o raz *in vitro* zostały podane w opisach rycin przedstawiających wyniki.

5.13. Lista odczynników

Tabela 6. Spis pozostałych odczynników wykorzystanych w trakcie badań, które nie zostały wymienione w tekście rozdziału Materiały i metody.

Nazwa odczynnika	Dostawca
2,6-di-tetr-butylo-4-metylofenol (BHT)	Fluka
2-merkaptoetanol	Acros
Agar-Agar	Carl Roth
Agaroza	ABO
Akrylamid/bis-akrylamid (29:1, 40 %)	Sigma-Aldrich
Albumina surowicy bydlęcej (BSA)	BioShop
Albumina surowicy bydlęcej wolna od kwasów tłuszczowych	BioShop
Alkohol etylowy	POCH
Alkohol izopropylowy	POCH
Amoniak	POCH
Antybiotyki: Streptomycyna i Penicylina	Sigma-Aldrich
Aprotynina	Sigma-Aldrich
Azydek sodu (NaN ₃)	POCH
Błękit bromofenolowy	POCH
Błękit nitrotetrazolowy	РОСН
Bufor R (10x)	Thermo Scientific
Chlorek potasu (KCl)	POCH
Chlorek sodu (NaCl)	POCH
Chloroform	POCH
Czerwień oleista O (Oil Red O)	Sigma-Aldrich
Czerwień Ponceau	Sigma-Aldrich
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Fluka
Ditiotreitol (DTT)	Fisher Biotech
DNaza	Thermo Scientific
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	РОСН
Ekstrakt z drożdży	Merck
Eter izopropylowy	Fluka
Eter polimeru glikolu polietylenowego i p-tert-oktylofenolu (Triton X-100)	Acros
Fibronektyna	Sigma-Aldrich
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma-Aldrich
Fluoresceina	POCH

Fluorescencyjny barwnik do żelu agarozowego (Syngen GreenDNA Gel	Syngen
Stain)	Syngen
Glicerol	POCH
Glicyna	Carl Roth
Glukoza	Sigma-Aldrich
Heksan	Fluka
Heptan	POCH
Izofluran	Baxter
Izopropanol	POCH
jetPRIME	Polyplus
Kanamycyna	Carl Roth
Ksylen	POCH
Kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynylo] atanosulfonowy (HEPES)	Sigma-Aldrich
Kwas askorbinowy	Sigma-Aldrich
Kwas cytrynowy	CHEMPUR
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	РОСН
Kwas etylenoglikol-bis-(2-aminoetylo)-tetraoctowy (EGTA)	Acros
Kwas nonadekanowy	Sigma-Aldrich
Kwas octowy (CH ₃ COOH)	РОСН
Kwas ortofosforanowy (H ₃ PO ₄)	РОСН
Kwas siarkowy (H ₂ SO ₄)	РОСН
Kwas solny (HCl)	CHEMPUR
Leupeptyna	Roth
L-glutamina	Sigma-Aldrich
Marker wielkości białek (PageRulerTM Plus Prestained Ladder)	Thermo Scientific
Marker wielkości DNA (GeneRulerTM DNA Ladder)	Thermo Scientific
Metanol	РОСН
Mieszanina SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad
Monolaurynian polioksyetylenosorbotolu (Tween 20)	Sigma-Aldrich
N',N',N',N'-tatrametyloetylenodiamina (TEMED)	Sigma-Aldrich
Nadsiarczan amonu (APS)	РОСН
Norepinefrvna	Sigma-Aldrich
Odczynnik do hemiluminescencji Super SignalTM West Pico PLUS	
Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific
Oleinian sodu	Sigma-Aldrich
Ortowanadan sodu (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehvd (PFA)	Sigma-Aldrich
Pepstatyna A	BioShop
Pepton	Merck
Płodowa surowica bydleca (FBS)	Gibco
Pożywka Clycomb	Sigma-Aldrich
Roztwór buforowanej fosforanem soli fiziologicznej (PBS)	Biowest
Siarczan magnezu (MgSO ₄)	РОСН
Siarczan miedzi (CuSO ₄)	POCH
Stearynian sodu	Sigma-Aldrich
Trifluorek boru (BE ₂)	Sigma-Aldrich
Tris (hydroksymetylo) aminometan	Sigma-Aldrich
Trycyna	BioShop
Trypsyna	Sigma-Aldrich
Wodorotlenek sodu (NaOH)	POCH
Wzorzec linidów FAMF (fatty acids methyl esters)	Supelco
Żelatyna	Sigma-Aldrich
	1

Zestawy odczynników	
Zestaw do badania ilości wydzielanej insuliny (Rat/Mouse insulin ELISA	Milipore
Kit)	winipore
Zestaw do izolacji plazmidów (Plasmid Midi AX)	A&A Biotechnology
Zestaw do oczyszczania DNA z żelu (Gel-Out Concentrator)	A&A Biotechnology
Zestaw do odwrotnej transkrypcji (RevertAid First Strand cDNA Synthesis	Thormo Sojontifio
Kit)	Thermo Scientific
Zestaw do oznaczania przeżywalności komórek (CellTiter-Blue Cell	Promega
Viability Assay)	
Zestaw do oznaczania stężenia białka (DC protein Assay)	Bio-Rad
Zestaw do PCR (FastStart Taq DNA Polymerase)	Roche
Zestaw do wygaszania autofluorescencji tkanki (ReadyProbes Tissue	Invitrogon
Autofluorescence Quenching Kit)	mvnuogen

6. Wyniki

6.1. Wpływ wyciszenia ekspresji *Scd4* na strukturę i funkcję serca

6.1.1. Charakterystyka fenotypu myszy SCD4^{-/-}

6.1.1.1. Masa zwierząt

Myszy SCD4^{-/-} w wieku 15 tygodni, w dniu rozpoczęcia eksperymentu (punkt czasowy 0), miały mniejszą masę ciała niż myszy WT w tym samym wieku (Ryc. 13A). Efekt ten utrzymał się przez cały eksperyment w grupach SCD4^{-/-} chow i WT chow, ponieważ tempo przyrostu masy ciała było takie samo (Ryc. 13B). W celu wywołania otyłości myszy karmiono paszą HFD. Myszy z grupy WT HFD miały zwiększoną końcową masę ciała (punkt czasowy 8 tygodni) o 44 % w odniesieniu do masy wyjściowej, natomiast u myszy SCD4^{-/-} HFD o 26 % w stosunku do masy wyjściowej (Ryc. 13B). Zaobserwowane zmiany w masie ciała myszy SCD4^{-/-} w porównaniu do WT nie były spowodowane różną ilością spożywanego pokarmu, ponieważ dzienne spożycie paszy było zbliżone we wszystkich grupach eksperymentalnych (Ryc. 13C).



Ryc. 13. Masa ciała myszy WT i SCD4^{-/-}. (A) Wyjściowa masa myszy na początku eksperymentu; (B) zmiana masy ciała wyrażona w procentach w odniesieniu do masy wyjściowej; (C) średnia ilość paszy spożywanej w ciągu jednej doby przez jedną mysz podczas eksperymentu. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; $n \ge 10$ myszy/grupa; * – p < 0,05; a – p < 0,05 WT HFD vs. WT chow; b – p < 0,05 SCD4^{-/-} HFD vs WT HFD; c - p < 0,05 SCD4^{-/-} HFD vs SCD4^{-/-} chow.

Wyniki

U myszy z grupy SCD4^{-/-} HFD w porównaniu do myszy z grupy WT HFD stwierdzono znacznie niższą masę trzewnej tkanki tłuszczowej (Ryc. 14A), a co za tym idzie obniżony, obliczony na tej podstawie, poziom stłuszczenia ciała (Ryc. 14B). Masa serca, jak również stosunek masy serca do długości kości piszczelowej, były podobne w trzech grupach eksperymentalnych, oprócz grupy SCD4^{-/-} HFD, w której parametry te były wyższe względem grupy SCD4^{-/-} chow (Ryc. 14C,D). Myszy WT HFD miały niższy stosunek masy serca do masy ciała w porównaniu do myszy WT chow, natomiast między grupami SCD4^{-/-} HFD i SCD4^{-/-} chow nie stwierdzono różnicy (Ryc. 14E).



Ryc. 14. Masa trzewnej tkanki tłuszczowej i serca u myszy WT i SCD4^{-/-}. (A) Masa trzewnej tkanki tłuszczowej; (B) poziom stłuszczenia ciała, obliczony jako iloraz masy trzewnej tkanki tłuszczowej i masy ciała myszy, wyrażony w procentach; (C) masa serca; (D) stosunek masy serca do długości kości piszczelowej; (E) stosunek masy serca do masy ciała myszy. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; $n \ge 10$ myszy/grupa; a - p < 0.05 vs. WT chow; b - p < 0.05 vs. WT HFD; c - p < 0.05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.1.1.2. Składniki osocza

Myszy z grupy WT HFD miały wyższe stężenie glukozy (o 28 %), insuliny (o 206 %) i cholesterolu (o 74 %) w osoczu w porównaniu do grupy WT chow (Tabela 7). W osoczu myszy z grupy SCD4^{-/-} HFD w odniesieniu do SCD4^{-/-} chow, poziom glukozy nie uległ zmianie, natomiast poziom insuliny wzrósł o 57 %, a cholesterolu o 73 %. Ponadto, myszy SCD4^{-/-} chow i SCD4^{-/-} HFD miały niższe stężenie cholesterolu w osoczu w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych WT. Poziom TG i FFA był podobny we wszystkich badanych grupach (Tabela 7).
	WT		SCD4-/-	
	chow	HFD	chow	HFD
Glukoza [mg/dl]	$174,0 \pm 28,1$	$222,2\pm25,4^{\mathrm{a}}$	$168,5 \pm 31,8^{b}$	$190,7 \pm 23,8$
Insulina [ng/ml]	$1,5 \pm 0,1$	$4,6\pm0,2^{\mathrm{a}}$	$1,4\pm0,1^{b}$	$2,2\pm0,5^{\mathrm{a,b,c}}$
Cholesterol [mg/dl]	$85,5 \pm 8,3$	$149,1 \pm 17,6^{a}$	$71,5\pm11,6^{\mathrm{a,b}}$	$123,8\pm21,8^{\mathrm{a,b,c}}$
TG [mg/dl]	$130,9 \pm 35,9$	$131,2 \pm 28,2$	$113,5 \pm 21,5$	$130,3 \pm 25,4$
FFA [mg/dl]	$24,1 \pm 7,3$	$20,9\pm5,3$	$23,0 \pm 6,0$	$22,3\pm5,0$

Tabela 7. Stężenie glukozy, insuliny, cholesterolu, triacylogliceroli (TG) i wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w osoczu myszy WT i SCD4^{-/-} karmionych paszami chow i HFD.

Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; $n \ge 10$ myszy/grupa; a - p < 0.05 vs. WT chow; b - p < 0.05 vs. WT HFD; c - p < 0.05 vs. SCD4-/- chow.

6.1.1.3. Tolerancja glukozy i współczynnik insulinooporności

Myszy WT i SCD4^{-/-} karmione paszą HFD rozwinęły nietolerancję glukozy, tj. poziom glukozy nie spadł do wartości wyjściowych po 120 min od jej dootrzewnowego podania (Ryc. 15A). Współczynnik insulinooporności (HOMA-IR), określający odpowiedź tkanek obwodowych na insulinę, był ponad 4-krotnie oraz 1,85-krotnie wyższy u myszy grupy WT HFD i SCD4^{-/-} HFD w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych chow (Ryc. 15B). Zwiększona wartość współczynnika HOMA-IR oraz wysoki poziom glukozy na zakończenie testu tolerancji glukozy sugerują rozwinięcie insulinooporności przez myszy WT HFD. Natomiast u myszy SCD4^{-/-} HFD długoterminowa odpowiedź tkanek obwodowych na insulinę jest poprawiona względem grupy WT HFD o czym świadczy obniżona wartość współczynnika HOMA-IR i poziom glukozy na czczo.



Ryc. 15. (A) Test tolerancji glukozy i (B) współczynnik HOMA-IR. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; $n \ge 10 \text{ myszy/grupa}$; a - p < 0.05 WT HFD vs. WT chow; b - p < 0.05 vs. WT HFD; $c - p < 0.05 \text{ SCD4}^{-/-}$ HFD vs. SCD4^{-/-} chow.

6.1.1.4. Zawartość lipidów w sercu

Przeprowadzona analiza zawartości lipidów obojętnych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej wykazała niższy poziom TG w sercu myszy SCD4^{-/-} w porównaniu do myszy WT (o 24 % w grupach chow i 40 % w grupach HFD, odpowiednio) (Ryc. 16A,B). Ponadto powierzchnia kropli lipidowych w sercu myszy SCD4^{-/-} HFD była o 17 % mniejsza w porównaniu do myszy WT HFD (Ryc. 16C,D).



Ryc. 16. Zawartość lipidów w sercu. (A) Płytka chromatograficzna prezentująca rozdział lipidów obojętnych lewej komory serca: TG, triacyloglicerole; FFA, wolne kwasy tłuszczowe; DAG, diacyloglicerole; **(B)** wynik analizy densytometrycznej zawartości lipidów w sercu; **(C)** reprezentatywne zdjęcia kropli lipidowych (kolor żółty) w przekroju poprzecznym lewej komory serca, wykonane przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), skala wskazuje 2 μ m; **(D)** powierzchnia kropli lipidowych obliczona na podstawie zdjęć TEM. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; (B) n ≥ 10 myszy/grupa; (D) n ≥ 250 LDs; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

W celu analizy zawartości FAs w lipidach neutralnych przeprowadzono ich analizę za pomocą GC-MS. Wyniki GC-MS potwierdziły obniżony poziom lipidów w sercu myszy grupy SCD4^{-/-} HFD, tj. zawartość TG była o 32 % mniejsza w porównaniu do zwierząt grupy WT HFD (1,39 µmol/g i 2,05 µmol/g, odpowiednio) (Ryc. 17A). TG stanowiły większość lipidów neutralnych zawartych w sercu i wraz z FFA i DAG stanowiły ponad 81 % całej puli lipidów neutralnych (Ryc. 17B), dlatego w dalszej części pracy skupiono się na tych trzech frakcjach.

Serca myszy z grupy SCD4^{-/-} chow charakteryzowały się niższym udziałem frakcji TG i większym udziałem frakcji FFA niż grupa WT chow (Ryc. 17B). We frakcjach TG, DAG i FFA mięśnia sercowego myszy obu genotypów, HFD spowodowała 34-46 % spadek zawartości kwasu linolowego (C18:2(n-6)) i 37-139 % wzrost zawartości kwasu oleinowego (C18:1(n-9)), a w konsekwencji 21-34 % spadek zawartości PUFA i 22-65 % wzrost zawartości MUFA względem odpowiednich grup chow (Tabela 8, Tabela 9, Tabela 10). Zawartość SFA uległa podwyższeniu w sercach myszy obu genotypów w odpowiedzi na karmienie paszą HFD tylko we frakcji TG (Tabela 10). Ponadto we frakcji TG w sercu myszy grupy SCD4^{-/-} chow

procentowa zawartość SFA oraz MUFA była wyższa, natomiast PUFA niższa względem grupy WT chow (Ryc. 17C). Udział MUFA był zwiększony również w grupie SCD4^{-/-} HFD względem WT HFD. Szczegółowe wyniki zawartości kwasów tłuszczowych w sercu przedstawiono w Tabelach 8, 9 oraz 10.

Procentowa zawartość kwasu palmitynowego (C16:0) i stearynowego (C18:0) we frakcji TG była wyższa w grupach HFD w odniesieniu do grup chow u myszy WT o 21 % i 78 %, a u myszy SCD4^{-/-} o 14% i 40 %, odpowiednio (Tabela 10). W sercu myszy SCD4^{-/-} chow i SCD4^{-/-} HFD zawartość kwasu oleinowego (C18:1(n-9)) była większa (odpowiednio o 14 % i 6 %) w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych WT. Udział C18:0 również był większy o 15 % w grupie SCD4^{-/-} chow w porównaniu do WT chow, natomiast w grupie SCD4^{-/-} HFD było go mniej o 8 % niż w WT HFD (Tabela 10). W sercu myszy obu genotypów karmionych paszą HFD współczynnik desaturacji C16:0 (C16:1/C16:0) był obniżony, a C18:0 (C18:1/C18:0) podwyższony. Ponadto w grupie SCD4^{-/-} HFD współczynnik desaturacji C18:0 był wyższy, względem WT HFD (Ryc. 17D).

Reasumując, we frakcjach TG, DAG i FFA w sercu myszy obu genotypów karmionych HFD stwierdzono spadek zawartości PUFA i wzrost MUFA (m.in. C18:1(n-9)), a w TG dodatkowo wzrost SFA (m.in. C16:0 i C18:0). We frakcji TG serc myszy SCD4^{-/-} chow zmiany względem grupy WT chow były podobne do tych spowodowanych przez HFD, tj. obniżona była zawartość PUFA, a podwyższona zawartość MUFA (w tym C18:1(n-9)) i SFA (w tym C16:0 i C18:0), ale w kilkukrotnie mniejszym stopniu. HFD u myszy WT i SCD4^{-/-} spowodował spadek współczynnika desaturacji C16:1/C16:0, a wzrost C18:1/C18:0, względem odpowiednich grup chow.

Wyniki



Ryc. 17. Zawartość lipidów neutralnych w sercach myszy określona na podstawie analizy GC-MS. (A) Zawartość triacylogliceroli (TG) w sercu; (B) molowy udział procentowy (mol%) poszczególnych frakcji lipidów neutralnych w sercu myszy: triacylogliceroli (TG), wolnych kwasów tłuszczowych (FFA), diacylogliceroli (DAG), estrów cholesterolu (CE), estrów wosków (WE), wolnego cholesterolu (Chol.); (C) molowy udział procentowy (mol%) kwasów tłuszczowych nasyconych (SFA), jednonienasyconych (MUFA) i wielonienasyconych (PUFA); (D) współczynnik desaturacji obliczony na podstawie stosunku zawartości kwasu nasyconego (stearynowego lub palmitynowego) do kwasu jednonienasyconego (oleinowego lub palmitooleinowego, odpowiednio). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n = 9 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

	FFA			
	WT chow	WT HFD	SCD4-/- chow	SCD4-/- HFD
C14:0	1,9 ± 0,3	$2,0 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,2^{a,b,c}$
C16:1	$1,6 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$
C16:0	22,7 ± 1,7	24,6 ± 0,4	$22,4~\pm~0,5$	24,9 ± 1,1
C18:2(n-6)	$18,3 \pm 1,5$	$10,5 \pm 1,1^{a}$	$21,2 \pm 1,4^{b}$	$11,4 \pm 2,2^{a,c}$
C18:1(n-9)	$7,6 \pm 0,3$	$13,7 \pm 0,8^{a}$	$9,5 \pm 0,8^{a,b}$	$12,9 \pm 0,9^{a,c}$
C18:1(n-7)	$1,9 \pm 0,2$	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	$2,3~\pm~0,3$
C18:0	$20,7~\pm~1,6$	$22,5 \pm 0,8$	$17,9 \pm 1,2^{b}$	$20,3 \pm 1,7$
C20:4(n-6)	$11,0 \pm 1,1$	11,1 ± 1,0	$11,2 \pm 0,5$	$12,3 \pm 2,6$
C20:5(n-3)	$0,9 \pm 0,2$	$0,8\pm0,1$	$0,7\pm0,1$	$0,7 \pm 0,1$
20:3(n-6)	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	1,1 ± 0,1	$0,9 \pm 0,1$
C20:2(n-6)	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$
C20:1	$1,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$
C20:0	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,2$
C22:6(n-3)	$3,6 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,2^{a}$	$3,3 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,2^{a}$
C22:1(n-9)	2,1 ± 0,6	$1,5 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,4$
C22:0	$1,0 \pm 0,3$	0,9 ± 0,2	$0,8\pm0,1$	$0,8 \pm 0,3$
C24:0	$1,8 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,5$
SFA	49,7 ± 3,5	$53,2 \pm 0,7$	46,1 ± 1,6	$52,0 \pm 3,6$
MUFA	$14,5 \pm 1,1$	$19,8 \pm 1,3^{a}$	$15,7 \pm 0,6^{b}$	$19,0 \pm 1,9^{a,c}$
PUFA	35,8 ± 2,5	$27,0 \pm 2,0^{a}$	$38,2 \pm 1,7^{\rm b}$	$29,0 \pm 4,5^{c}$

Tabela 8. Molowy udział procentowy (mol%) kwasów tłuszczowych we frakcji FFA w lewej komorze serca myszy.

C14:0, kwas mirystynowy; C16:1, kwas palmitooileinowy; C16:0, kwas palmitynowy; C18:2(n-6), kwas linolowy; C18:1(n-9), kwas oleinowy; C18:1(n-7), kwas cis-wakcenowy; C18:0, kwas stearynowy; C20:4(n-6), kwas arachidonowy; C20:5(n-3), kwas eikozapentaenowy; C20:3(n-6), kwas dihomo- γ -linolenowy; C20:2(n-6), kwas cis-11,14-eikozadienowy; C20:1, kwas gondolowy; C20:0, kwas arachidowy; C22:6(n-3), kwas dokozaheksaenowy; C22:1(n-9), kwas erukowy; C22:0, kwas behenowy; C24:0, kwas lignocerynowy; SFA, nasycone kwas tłuszczowe; MUFA, jednonienasycone kwas tłuszczowe; PUFA, wielonienasycone kwas tłuszczowe. Wyniki przedstawiono w jednostkach mol% jako średnią ± SD n = 9 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

	DAG			
	WT chow	WT HFD	SCD4-/- chow	SCD4-/- HFD
C14:0	2,1 ± 0,3	2,8 ± 0,1	3,1 ± 0,7	$2,6~\pm~0,5$
C16:1	$1,4 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,3$
C16:0	$17,3 \pm 1,2$	$20,5~\pm~0,6^a$	$18,1 \pm 1,0$	$19,9 \pm 0,7^{a}$
C18:2(n-6)	$23,4 \pm 2,9$	$14,7 \pm 1,3^{a}$	$21,2 \pm 3,4^{b}$	$13,9 \pm 2,0^{\rm a,c}$
C18:1(n-9)	9,6 ± 0,9	$17,6 \pm 1,1^{a}$	$9,6 \pm 2,3^{b}$	$17,5 \pm 1,7^{a,c}$
C18:1(n-7)	$3,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,1$	3,3 ± 0,4	$3,5 \pm 0,4$
C18:0	16,4 ± 1,9	$16,4 \pm 0,5$	$16,3 \pm 1,3$	$16,9 \pm 1,0$
C20:4(n-6)	$9,8\pm0,7$	8,9 ± 0,8	$9,3\pm0,7$	9,0 ± 1,4
C20:5(n-3)	0,9 ± 0,1	$0,8\pm0,1$	0,9 ± 0,1	$1,0 \pm 0,1$
20:3(n-6)	$1,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
C20:2(n-6)	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$
C20:1	$1,8 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$2,7 \pm 1,4$	$1,6 \pm 0,1$
C20:0	$1,3 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,6$
C22:6(n-3)	$4,5~\pm~0,3$	$3,8 \pm 0,5$	$3,6 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,3$
C22:1(n-9)	$2,4~\pm~0,7$	$1,8 \pm 0,2$	3,2 ± 1,9	$2,3~\pm~0,3$
C22:0	$1,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$
C24:0	$2,0~\pm~0,3$	$1,8 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,4$
SFA	40,2 ± 3,8	43,6 ± 1,3	42,1 ± 2,7	43,7 ± 1,5
MUFA	$18,6~\pm~0,1$	$25,8 \pm 1,3^{a}$	$20,4 \pm 2,9^{b}$	$26,5 \pm 1,3^{a,c}$
PUFA	41,2 ± 3,8	$30,6 \pm 1,9^{a}$	37,5 ± 4,9	$29,8 \pm 0,6^{a}$

Tabela 9. Molowy udział procentowy (mol%) kwasów tłuszczowych we frakcji DAG w lewej komorze serca myszy.

C14:0, kwas mirystynowy; C16:1, kwas palmitooileinowy; C16:0, kwas palmitynowy; C18:2(n-6), kwas linolowy; C18:1(n-9), kwas oleinowy; C18:1(n-7), kwas cis-wakcenowy; C18:0, kwas stearynowy; C20:4(n-6), kwas arachidonowy; C20:5(n-3), kwas eikozapentaenowy; C20:3(n-6), kwas dihomo- γ -linolenowy; C20:2(n-6), kwas cis-11,14-eikozadienowy; C20:1, kwas gondolowy; C20:0, kwas arachidowy; C22:6(n-3), kwas dokozaheksaenowy; C22:1(n-9), kwas erukowy; C22:0, kwas behenowy; C24:0, kwas lignocerynowy; SFA, nasycone kwas tłuszczowe; MUFA, jednonienasycone kwas tłuszczowe; PUFA, wielonienasycone kwas tłuszczowe. Wyniki przedstawiono w jednostkach mol% jako średnią ± SD n = 9 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

	TG			
	WT chow	WT HFD	SCD4-/- chow	SCD4-/- HFD
C14:0	1,1 ± 0,1	$1,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3^{a}$	$1,4 \pm 0,1$
C16:1	$2,7 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,5^{\circ}$
C16:0	15,1 ± 1,1	$18,2 \pm 0,5^{a}$	16,4 ± 0,9	$18,7 \pm 0,4^{\rm a,c}$
C18:2(n-6)	42,6 ± 1,3	$27,1 \pm 0,4^{a}$	$41,1 \pm 1,9^{b}$	$27,0 \pm 1,3^{a,c}$
C18:1(n-9)	$11,3 \pm 0,6$	$27,0 \pm 0,7^{a}$	$12,9 \pm 0,6^{a}$	$28,6 \pm 0,5^{a,b,c}$
C18:1(n-7)	$3,3 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1^{a}$	$3,2 \pm 0,1^{b}$	$2,4 \pm 0,5^{a,c}$
C18:0	4,5 ± 0,1	$8,0 \pm 0,2^{a}$	$5,2 \pm 0,3^{a,b}$	$7,3 \pm 0,2^{a,b,c}$
C20:4(n-6)	$6,2 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,3^{a}$	$5,4 \pm 0,2^{a,b}$	$4,1 \pm 0,4^{a,c}$
C20:5(n-3)	$0,4\pm0,1$	$0,3 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
20:3(n-6)	$2,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1^{a}$	$1,5 \pm 0,1^{a,b}$	$0,9 \pm 0,1^{a,b,c}$
C20:2(n-6)	$0,8\pm0,1$	$1,1 \pm 0,1^{a}$	$0,7 \pm 0,0^{\mathrm{b}}$	$1,0 \pm 0,1^{a,c}$
C20:1	$2,0 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1^{a}$	$1,7 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1^{a}$
C20:0	$0,7\pm0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1^{a}$
C22:6(n-3)	$5,5 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,4^{a}$	$3,9 \pm 0,4^{a}$	$3,3 \pm 0,5^{a}$
C22:1(n-9)	$0,8\pm0,1$	$0,4 \pm 0,1^{a}$	$0,8\pm0,1^{\mathrm{b}}$	$0,5 \pm 0,1^{a,c}$
C22:0	$0,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1^{a}$	$0,4 \pm 0,1^{\mathrm{b}}$	$0,2 \pm 0,1^{a,c}$
C24:0	$0,7\pm0,1$	$0,3 \pm 0,1^{a}$	$0,7 \pm 0,1^{\mathrm{b}}$	$0,4 \pm 0,1^{\rm a,c}$
SFA	$22,5 \pm 1,1$	$28,8 \pm 0,2^{a}$	$24,9 \pm 1,1^{a,b}$	$28,5 \pm 0,6^{\rm a,c}$
MUFA	$20,1 \pm 0,7$	$33,1 \pm 0,7^{a}$	$22,2 \pm 1,3^{a,b}$	$34.8 \pm 0.5^{a,b,c}$
PUFA	57,4 ± 1,8	$38,1 \pm 0,5^{a}$	$52,9 \pm 2,4^{a,b}$	$36,7 \pm 0,9^{a,c}$

Tabela 10. Molowy udział procentowy (mol%) kwasów tłuszczowych we frakcji TG w lewej komorze serca myszy.

C14:0, kwas mirystynowy; C16:1, kwas palmitooileinowy; C16:0, kwas palmitynowy; C18:2(n-6), kwas linolowy; C18:1(n-9), kwas oleinowy; C18:1(n-7), kwas cis-wakcenowy; C18:0, kwas stearynowy; C20:4(n-6), kwas arachidonowy; C20:5(n-3), kwas eikozapentaenowy; C20:3(n-6), kwas dihomo- γ -linolenowy; C20:2(n-6), kwas cis-11,14-eikozadienowy; C20:1, kwas gondolowy; C20:0, kwas arachidowy; C22:6(n-3), kwas dokozaheksaenowy; C22:1(n-9), kwas erukowy; C22:0, kwas behenowy; C24:0, kwas lignocerynowy; SFA, nasycone kwas tłuszczowe; MUFA, jednonienasycone kwas tłuszczowe; PUFA, wielonienasycone kwas tłuszczowe. Wyniki przedstawiono w jednostkach mol% jako średnią ± SD n = 9 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.1.2. Struktura i funkcjonowanie serca

6.1.2.1. Analiza echokardiograficzna

Akumulacja lipidów w mięśniu sercowym wiąże się z zaburzeniami funkcjonowania tego organu, zwłóknieniem oraz przerostem kardiomiocytów (Rabkin i in. 2007, Wang i in. 2012, Schulze i in. 2016, Kruszewska i in. 2022). Przeprowadzone badanie echokardiograficzne wykazało zmniejszoną średnicę (EDD) i objętość (EDV) lewej komory serca w fazie końcoworozkurczowej u myszy z grupy SCD4^{-/-} chow w porównaniu do zdrowych myszy WT chow. W grupie WT HFD stwierdzono zmniejszoną EDD i EDV, większą RWT i zmniejszoną SV w odniesieniu do grupy WT chow. U myszy SCD4^{-/-} HFD nie stwierdzono żadnych zmian w sercu w odniesieniu do myszy SCD4^{-/-} chow (Tabela 11). HR, AWTd, PWTd, EF i CO były podobne we wszystkich badanych grupach (Tabela 11).

Reasumując, u myszy WT, ale nie u SCD4^{-/-}, doszło do koncentrycznej przebudowy lewej komory serca charakteryzującej się zwiększoną RWT z jednoczesnym spadkiem EDD, EDV i SV w warunkach otyłości. Serce myszy SCD4^{-/-} chow charakteryzowało się niższą EDD i EDV w porównaniu do serc grupy WT chow.

	WT chow	WT HFD	SCD4 ^{-/-} chow	SCD4 ^{-/-} HFD
Tętno [min ⁻¹]	361 ± 18	333 ± 39	336 ± 50	345 ± 38
AWTd [mm]	0,83±0,03	$0,91 \pm 0,06$	$0,87 \pm 0,09$	$0,91 \pm 0,09$
PWTd [mm]	$0,91 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,07$	$1,04 \pm 0,12$
EDD [mm]	4,10±0,12	$3,73 \pm 0,17^{a}$	$3,66 \pm 0,21^{a}$	$3,67 \pm 0,36^{a}$
EDV [µl]	72,13±6,60	$54,48 \pm 7,18^{a}$	$51,89 \pm 8,71^{a}$	$53,28 \pm 14,66^{a}$
RWT	$0,\!44 \pm 0,\!02$	$0,55 \pm 0,01^{a}$	$0,52 \pm 0,04$	$0,57 \pm 0,09^{a}$
SV [µl]	50,96±3,72	$37,35 \pm 4,39^{a}$	39,06±8,74	40,53±11,79
EF [%]	$70,67 \pm 1,51$	68,67±1,37	75,00±11,24	75,67±2,73
CO [ml/min]	$17,75 \pm 1,23$	12,64±2,86	12,91 ± 2,82	13,81±4,20

Tabela 11. Parametry struktury i funkcji serca myszy WT i SCD4^{-/-} karmionych dietą chow i HFD.

AWTd, grubość przedniej ściany lewej komory serca w rozkurczu; PWTd, grubość tylnej ściany lewej komory serca w rozkurczu; EDD, końcoworozkurczowa średnica lewej komory serca; EDV, końcoworozkurczowa objętość lewej komory serca; RWT, względna grubość ściany lewej komory serca; SV, objętość wyrzutowa; EF, frakcja wyrzutowa; CO, pojemność minutowa. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; n = 5 myszy/grupa; a –p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.1.2.2. Zwłóknienie mięśnia sercowego, rozmiar kardiomiocytów i struktura sarkomerów

Przeprowadzone analizy nie wykazały różnic w powierzchni kolagenu w ścianie lewej komory serca wybarwionego czerwienią Syriusza pomiędzy badanymi grupami (Ryc. 18A,B). Dodatkowo zawartość białka kolagenu typu I (Col1α2) również była na podobnym poziomie we wszystkich grupach (Ryc. 18C,D).



Ryc. 18. Zwłóknienie lewej komory serca. (A) Reprezentatywne zdjęcia preparatów mięśnia sercowego barwionych czerwienią Syriusza wykonane z wykorzystaniem obiektywu o 20-krotnym powiększeniu, skala wskazuje 40 μ m; (**B**) wynik analizy zdjęć preparatów mikroskopowych otrzymany za pomocą programu ImageJ z pomiaru wybarwionych na czerwono powierzchni włókien kolagenu w przestrzeni śródmiąższowej; (**C**) reprezentatywny immunoblot oraz (**D**) wyniki analizy densytometrycznej zawartości białka kolagenu typu I. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD, (A, B) n = 3 myszy/grupa, (C, D) n ≥ 10 myszy/grupa.

W przekroju poprzecznym lewej komory serca myszy WT i SCD4^{-/-} karmionych paszą HFD stwierdzono zwiększoną powierzchnię kardiomiocytów w porównaniu do odpowiednich grup chow (Ryc. 19A,B). Długość sarkomerów była podobna we wszystkich badanych grupach (Ryc. 19C,D).

Podsumowując, wywołana eksperymentalnie otyłość spowodowała przerost kardiomiocytów u myszy obu genotypów, nie wywołując jednocześnie zwłóknienia i zmian w strukturze sarkomerów. Kardiomiocyty myszy z grup SCD4^{-/-} chow i SCD4^{-/-} HFD nie różniły się pod względem powierzchni od odpowiadających im grup WT.



Ryc. 19. Rozmiar kardiomiocytów i struktura sarkomerów. (A) Reprezentatywne zdjęcia ściany lewej komory serca, barwionej hematoksyliną i eozyną, wykonane z wykorzystaniem obiektywu o 40-krotnym powiększeniu, skala wskazuje 10 μ m; (**B**) rozmiar kardiomiocytów określony na podstawie analizy zdjęć preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną; (**C**) reprezentatywne zdjęcia sarkomerów, w przekroju podłużnym lewej komory serca, wykonane przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), skala wskazuje 2 μ m; (**D**) długość sarkomerów obliczona na podstawie analizy zdjęć TEM. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n = 3 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.1.3. Zawartość lipidów w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją Scd4

W celu symulacji warunków panujących *in vivo* w sercu otyłych myszy, komórki HL-1 traktowano 18:0. Komórki kontrolne, transfekowane kontrolą negatywną siRNA (non-targ) inkubowane z 18:0, charakteryzowały się wzmożoną akumulacją lipidów w postaci kropli lipidowych (Ryc. 20A) oraz 81 % wzrostem absorbancji wyekstrahowanego barwnika Oil Red O w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normalnych (traktowanych BSA) (Ryc. 20B). Komórki HL-1 z obniżoną ekspresją *Scd4* (siSCD4) traktowane 18:0 cechowała niższa zawartość kropli lipidowych (Ryc. 20A) względem grupy non-targ 18:0 i 51 % wzrost absorbancji wyekstrahowanego barwnika Oil Red O w porównaniu do siSCD4 BSA (Ryc. 20B). Ponadto zahamowana ekspresja *Scd4* spowodowała spadek poziomu TG, DAG i FFA w warunkach normalnych (BSA) oraz TG i FFA w obecności 18:0 względem komórek kontrolnych (non-targ) BSA i 18:0, odpowiednio (Ryc. 20C,D).

Reasumując, komórki HL-1 w warunkach traktowania 18:0 charakteryzowały się wzmożoną akumulacją kropli lipidowych i TG, a zahamowanie ekspresji *Scd4* spowodowało spadek nagromadzenia lipidów.



Ryc. 20. Zawartość lipidów w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją *Scd4.* (A) Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe kropli lipidowych (żółte strzałki) o barwie ciemnoczerwonej w komórkach HL-1 kontrolnych (non-targ) oraz komórkach HL-1 z wyciszoną ekspresją *Scd4* (siSCD4) traktowanych kwasem stearynowym (18:0) lub BSA, barwionych czerwienią oleistą (Oil Red O). Zdjęcia wykonano z wykorzystaniem obiektywu o 20-krotnym powiększeniu, skala wskazuje 20 μ m. (B) wynik pomiaru absorbancji wyekstrahowanego barwnika Oil Red O; (C) chromatografia cienkowarstwowa (TLC) lipidów obojętnych: TG, triacyloglicerole; FFA, wolne kwasy tłuszczowe; DAG, diacyloglicerole; (D) wynik densytometrii płytki TLC. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n = 3 niezależne eksperymenty; a – p < 0,05 vs. non-targ BSA; b – p < 0,05 vs. non-targ 18:0; c – p < 0,05 vs. siSCD4 BSA.

6.1.4. Zawartość lipidów w komórkach HL-1 z nadekspresją Scd4

W celu oceny, czy nadekspresja *Scd4* w kardiomiocytach wywoła efekt odwrotny do obserwowanego w komórkach z wyciszeniem *Scd4* i przyczyni się do zwiększonej akumulacji lipidów, komórki HL-1 transfekowano wektorem zawierającym gen *Scd4* (pSCD4). W komórkach transfekowanych pustym wektorem (pCMV6) traktowanych 18:0 stwierdzono akumulację kropli lipidowych (Ryc. 21A,B) w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normalnych (BSA). W komórkach ze zwiększoną ekspresją *Scd4* (pSCD4) nie zaobserwowano różnic w zawartości kropli lipidowych (Ryc. 21A,B) w porównaniu do grupy pCMV6. Wyższa ekspresja *Scd4* nie wywołała efektu odwrotnego do tego wywołanego

zahamowaną ekspresją *Scd4*, tj. nie zwiększyła poziomu TG i DAG w warunkach normalnych (BSA) oraz TG, DAG i FFA w warunkach traktowania 18:0 względem komórek kontrolnych pCMV6 BSA i pCMV6 18:0, odpowiednio (Ryc. 21C,D). W związku z brakiem zmian w akumulacji lipidów w warunkach zwiększonej ekspresji *Scd4*, co sugeruje, że była ona niefunkcjonalna, nie kontynuowano badań z wykorzystaniem tego modelu.



Ryc. 21. Zawartość kropli lipidowych w komórkach HL-1 ze zwiększoną ekspresją *Scd4.* (A) Reprezentatywne zdjęcia mikroskopowe kropli lipidowych (żółte strzałki) o barwie ciemnoczerwonej w komórkach HL-1 kontrolnych (pCMV6) oraz komórek HL-1 ze zwiększoną ekspresją *Scd4* (pSCD4) traktowanych kwasem stearynowym (18:0) lub BSA, barwionych czerwienią oleistą (OilRedO). Zdjęcia wykonano z wykorzystaniem obiektywu o 20-krotnym powiększeniu, skala wskazuje 20 µm. (B) wynik pomiaru absorbancji wyekstrahowanego barwnika Oil Red O; (C) chromatografia cienkowarstwowa (TLC) lipidów obojętnych: TG, triacyloglicerole; FFA, wolne kwasy tłuszczowe; DAG, diacyloglicerole; (D) wynik densytometrii płytki TLC. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; n = 3 niezależne eksperymenty; a – p < 0,05 vs. pCMV6 BSA; b – p < 0,05 vs. pCMV6 18:0; c – p < 0,05 vs. pSCD4 BSA.

6.2. Wpływ wyciszenia *Scd4* na szlaki metabolizmu lipidów w sercu

6.2.1. Analiza transkryptomiczna serc myszy SCD4-/-

Przy użyciu techniki nanoString dokonano pomiaru zawartości mRNA 748 genów, poprzez określenie liczby sygnałów pochodzących od fluorescencyjnej sondy wiążącej się w sposób specyficzny z cząsteczką mRNA badanego genu. Na Ryc. 22 przedstawiono rozkład zmian liczby odczytów cząsteczek mRNA, znormalizowanych względem genów referencyjnych. Spośród 748 w grupie HFD względem grupy chow istotnie statystycznie (p < 0,05) zmieniona została ekspresja 118 genów w sercu myszy WT oraz 129 genów w sercu myszy SCD4^{-/-} (Ryc. 22A,B). Wyciszenie ekspresji SCD4 wpłynął istotnie na ekspresję 68 i 62 genów względem grupy WT chow i WT HFD, odpowiednio (Ryc. 22C,D).



Ryc. 22. Wykresy typu "volcano plot" przedstawiające wynik analizy nanoString – zmiany zawartości mRNA. Zawartość mRNA 748 genów została porównana pomiędzy poszczególnymi grupami: (A) WT HFD względem WT chow; (B) SCD4^{-/-} HFD względem SCD4^{-/-} chow; (C) SCD4^{-/-} HFD względem WT HFD; (D) SCD4^{-/-} chow względem WT chow. Pozioma linia przerywana wskazuje poziom istotności statystycznej p = 0,05, natomiast pionowa wartość 0, czyli brak różnic w zawartości mRNA. Dla genów o najbardziej zmienionej zawartości mRNA umieszczono nazwy skrócone. Wyniki przedstawiono jako średnią, n = 9 myszy/grupa.

Korzystając z narzędzia DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, NIH, Huang i in. 2009, Sherman i in. 2022) określono przynależność genów o zmienionej zawartości mRNA do szlaków sygnałowych. Analiza wykazała, że 35-53 % wspomnianych genów zaangażowanych jest w szlaki metaboliczne (Ryc. 23A). Dalsza analiza zakwalifikowała je do szczegółowych ścieżek sygnałowych, które zostały przedstawione na Ryc. 23B-E, a które obejmują m.in. kardiomiopatię cukrzycową, szlak AMPK, ROS i insuliooporność (Ryc. 23B-E).



Ryc. 23. Szlaki sygnałowe, w które zaangażowane są geny o istotnie zmienionej zawartości mRNA. (A) Udział genów szlaków metabolicznych w całej puli genów o zmienionym poziomie mRNA. Szlaki metaboliczne o największej liczbie genów o zmienionym poziomie mRNA w grupach: (B) WT HFD względem WT chow; (C) SCD4-/- HFD względem SCD4-/- chow; (D) SCD4-/- HFD względem WT HFD; (E) SCD4-/- chow względem WT chow.

6.2.2. Proces lipogenezy w sercu myszy SCD4^{-/-}

W sercu myszy WT HFD stwierdzono spadek poziomu białka czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję genów lipogenezy – SREBP1c, zarówno formy niedojrzałej (preSREBP1c) jak i dojrzałej (mSREBP1c), oraz białek FAS i GPAT1 w porównaniu do grupy WT chow (Ryc. 24A,B). U myszy pozbawionych SCD4 efekt HFD względem grupy chow był odwrotny tj. wzrosła zawartość ww. białek. We wszystkich grupach poziom białka ACC był podobny. Mięsień sercowy myszy z grupy SCD4^{-/-} chow charakteryzował się zwiększonym poziomem preSREBP1c, GPAT1, DGAT2, w porównaniu do grupy WT chow (Ryc. 24A,B). Oba genotypy w warunkach HFD miały podniesiony poziom DGAT2 w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych. Liczba cząsteczek mRNA genów lipogenezy była podobna we wszystkich grupach, za wyjątkiem *Acacb*, których było więcej w sercu myszy WT HFD w porównaniu do kontroli chow (Ryc. 24C). Względna ekspresja genów *Scd1* i *Scd2* była podobna we wszystkich badanych grupach, a *Scd4* nie różniła się między grupami WT chow i WT HFD, natomiast nie została wykryta w grupach SCD4^{-/-} chow i SCD4^{-/-} HFD (Ryc. 24C,D).

Podsumowując, zmiany w zawartości białek FAS, GPAT1 i DGAT2 wywołane dietą HFD sugerują zaburzenia w procesach syntezy FAs i lipidów.

Wyniki



Ryc. 24. Wpływ wyciszenia genu *Scd4* na proces lipogenezy w sercu myszy. (A) Reprezentatywne immunobloty białek zaangażowanych w proces lipogenezy: preSREBP1c, niedojrzała forma białka wiążącego sterolowy element regulatorowy 1c; mSREBP1c, dojrzała forma białka wiążącego sterolowy element regulatorowy 1c; FAS, syntaza kwasów tłuszczowych; GPAT1, acylotransferaza glicero-3-fosforanu 1; ACC, karboksylaza acetylo-CoA; DGAT2, acylotransferaza diacyloglicerol 2; GAPDH, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; (B) wyniki analizy densytometrycznej; (C) znormalizowana liczba zliczeń cząsteczek mRNA genów białek lipogenezy: *Srebf1*, białko wiążące sterolowy element regulatorowy 1; *Acaca*, karboksylaza acetylo-CoA 1; *Acacb*, karboksylaza acetylo-CoA 2; *Fasn*, syntaza kwasów tłuszczowych; *Scd1*, desaturaza stearoilo-CoA 1; (D) względna ekspresja genów *Scd1*, *Scd2* i *Scd4*. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; n \geq 10 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4-/- chow.

6.2.3. Proces lipolizy w sercu myszy SCD4-/-

Stwierdzone zmiany w szklaku lipogenezy nie tłumaczą mniejszej akumulacji lipidów neutralnych w sercu myszy SCD4^{-/-}. Dlatego w następnym etapie zbadany został proces przeciwstawny do lipogenezy, tj. lipoliza. Aktywność ATGL była wyższa w kardiomiocytach myszy SCD4^{-/-} grup chow i HFD niż w tych pochodzących od myszy WT z tych samych grup, odpowiednio o 33 % i 47 % (Ryc. 25A). We wszystkich grupach względna ekspresja genów zaangażowanych w lipolizę (Pnpla2, Abhd5 i G0s2) była podobna (Ryc. 25B), a pomiędzy myszami WT i SCD4^{-/-} z tych samych grup chow i HFD nie było różnic w zawartości białka ATGL (Ryc. 25C,D). W sercu myszy z grupy SCD4-/- HFD w odniesieniu do WT HFD, poziom białek aktywujących ATGL (ABHD5 i PKA) był wyższy (Ryc. 25C,D). Również u myszy SCD4^{-/-} chow podwyższeniu uległ poziom białka PKA w porównaniu do myszy WT chow (Ryc. 25C,D). W sercu myszy WT, ale nie SCD4^{-/-}, zawartość białka G0S2, które hamuje aktywność ATGL, wzrosła w warunkach HFD, w odniesieniu do odpowiednich grup chow (Ryc. 25C,D). Poziom białka lipazy HSL w sercach myszy z grupy SCD4^{-/-} chow był niższy, natomiast w grupie HFD wyższy niż u odpowiadających im myszy WT (Ryc. 25C,D). Zawartość białka HSL z fosforylacją w pozycji S563 (pHSL(563)), zwiększającą aktywność HSL, była podobna w mięśniu sercowym myszy obu genotypów z tych samych grup chow i HFD, natomiast z fosforylacją w pozycji S565 (pHSL(565)), która hamuje aktywność lipazy, niższa w grupie SCD4^{-/-} chow względem WT chow (Ryc. 25C,D). Poziom fosforylacji pHSL(563) w sercach myszy z grupy SCD4^{-/-} chow był podobny, a pHSL(565) niższy w porównaniu do grupy WT chow. W grupie SCD4-/- HFD poziom obu fosforylacji HSL był niższy w porównaniu do WT HFD (Ryc. 25E).

Podsumowując, wyższa aktywność ATGL w sercu myszy SCD4^{-/-} była powiązana ze zwiększoną zawartością białek aktywujących ten enzym (ABHD5, PKA) oraz brakiem zmian w zawartości białka hamującego ATGL, tj. G0S2. Ponadto w sercach myszy z grupy SCD4^{-/-} chow i SCD4^{-/-} HFD poziom fosforylacji HSL w pozycji S565 był niższy w porównaniu do grup WT chow i WT HFD, odpowiednio. Wyniki te wskazują na wyższą aktywność lipolityczną w sercu myszy SCD4^{-/-}.



Wyniki

Ryc. 25. Wpływ wyciszenia ekspresji *Scd4* na proces lipolizy w sercu myszy. (A) Aktywność lipazy ATGL; (B) względna ekspresja genów *Pnpla2*, swoista dla adipocytów lipaza triacyloglicerolowa; *Abhd5*, O-acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3-fosforanu; *G0s2*, przełącznik molekularny faz G0/G1 cyklu komórkowego; (C) reprezentatywne immunobloty białek zaangażowanych w proces lipolizy: ATGL, swoista dla adipocytów lipaza triacyloglicerolowa; ABHD5, O-acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3-fosforanu; PKA, kinaza białkowa A; G0S2, przełącznik molekularny faz G0/G1 cyklu komórkowego; HSL, lipaza zależna od hormonów; pHSL(563), HSL z fosforylacją w pozycji S563; pHSL(565), HSL z fosforylacją w pozycji S563; pHSL(565), HSL z fosforylacją w pozycji S565; GAPDH, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; (D) wyniki analizy densytometrycznej; (E) poziom fosforylacji pHSL(563) i pHSL(565). Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n ≥ 10 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.2.4. Proces lipolizy w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją Scd4

Aby potwierdzić wpływ braku SCD4 na tempo lipolizy w sercu, przeprowadzono analogiczną analizę z wykorzystaniem modelu in vitro. Aktywność ATGL była wyższa w komórkach z wyciszoną ekspresją Scd4 niż w kontroli non-targ (Ryc. 26A). Poziom białek ATGL i G0S2 był podobny, a ABHD5 wyższy w grupie siSCD4 BSA niż w non-targ BSA, natomiast w grupie siSCD4 18:0 zawartość ATGL była wyższa w porównaniu do grupy nontarg 18:0 (Ryc. 26B,C). W komórkach kontrolnych (non-targ), ale nie w komórkach z wyciszeniem Scd4, poziom białka G0S2 hamującego aktywność ATGL, wzrósł w warunkach traktowania 18:0 w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normalnych (BSA). Poziom lipazy HSL w grupach siSCD4 BSA i siSCD4 18:0 był wyższy niż w odpowiednich grupach kontrolnych (Ryc. 26B,C). Zawartość białka pHSL(563) była podobna, a pHSL(565) niższa w komórkach z obniżoną ekspresją Scd4 hodowanych w warunkach normalnych, natomiast po traktowaniu 18:0 zawartość obydwu form białka była niższa w porównaniu do komórek kontrolnych w tych samych warunkach (Ryc. 26B,C). Poziom fosforylacji zwiększającej aktywność lipazy HSL tj. pHSL(563) był podobny, a pHSL(565) hamującej aktywność enzymu był niższy w grupie siSCD4 BSA w odniesieniu do grupy non-targ BSA (Ryc. 26D). W warunkach traktowania 18:0 poziom obu fosforylacji był niższy w komórkach z zahamowaną ekspresją Scd4 niż w komórkach kontrolnych (Ryc. 26D).

Reasumując, wyższa aktywność ATGL w komórkach z zahamowaną ekspresją *Scd4* była powiązana ze zwiększoną zawartością białka pozytywnie regulującego ten enzym (ABHD5) i brakiem zmian w poziomie białka hamującego aktywność ATGL tj. G0S2. Poziom fosforylacji pHSL565 był niższy w obu grupach siSCD4 BSA i 18:0. Przedstawione wyniki wskazują na wyższą aktywność lipolizy w warunkach zahamowanej ekspresji *Scd4* w kardiomiocytach.



Ryc. 26. Wpływ wyciszenia ekspresji *Scd4* na proces lipolizy w komórkach HL-1. (A) Aktywność lipazy ATGL; (B) reprezentatywne immunobloty białek zaangażowanych w proces lipolizy: ATGL, swoista dla adipocytów lipaza triacyloglicerolowa; ABHD5, O-acylotransferaza 1-acyloglicerolo-3-fosforanu; PKA, kinaza białkowa A; G0S2, przełącznik molekularny faz G0/G1 cyklu komórkowego; HSL, lipaza zależna od hormońów; pHSL(563), HSL z fosforylacją w pozycji S563; pHSL(565) HSL z fosforylacją w pozycji S565; (C) wyniki analizy densytometrycznej; (D) poziom fosforylacji pHSL(563) i pHSL(565). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; n = 3 niezależne eksperymenty; a – p < 0,05 vs. non-targ BSA; b – p < 0,05 vs. non-targ 18:0; c – p < 0,05 vs. siSCD4 BSA.

6.2.5. Proces β -oksydacji kwasów tłuszczowych w sercu myszy SCD4^{-/-}

FAs uwolnione w wyniku lipolizy mogą ulegać utlenianiu w mitochondriach. Dlatego przeanalizowano szlak β-oksydacji FAs w kardiomiocytach z wyciszoną ekspresją *Scd4*. Stwierdzono wzrost zawartości białek: PPARα, PGC-1α, pAMPK, CPT1, VLCAD (Ryc. 27A,B) oraz liczby cząsteczek mRNA genów: *Cpt1a*, *Acadl*, *Hadh* i *Acat1* w sercu myszy WT HFD i SCD4^{-/-} HFD względem odpowiednich grup kontrolnych chow (Ryc. 27C). Poziom fosforylacji AMPK, ale nie ACC, był wyższy w grupach WT HFD i SCD4^{-/-} HFD w porównaniu do WT chow i SCD4^{-/-} chow, odpowiednio (Ryc. 27D). Poziom białek PPARα, PGC-1α, AMPK, UCP3, a także poziom fosforylacji AMPK i ACC były niższe w mięśniu sercowym myszy grupy SCD4^{-/-} chow w porównaniu do grupy WT chow (Ryc. 27A,B,D). W grupie SCD4^{-/-} HFD względem grupy WT HFD stwierdzono mniejszą zawartość białek PPARα, VLCAD, fosforylację pAMPK i pACC oraz liczbę zliczeń genów *Acadl* i *Hadh* (Ryc. 27).

Reasumując, w warunkach HFD w sercu myszy obu genotypów doszło do wzrostu zawartości mRNA oraz białek zaangażowanych w proces β-oksydacji FAs, co wskazuje na wzrost aktywności tego szlaku. W porównaniu do grupy WT chow poziom większości z analizowanych białek był niższy w sercu myszy z grupy SCD4^{-/-} chow, a część z nich była niższa także w grupie SCD4^{-/-} HFD względem grupy WT HFD, co może sugerować niższy poziom β-oksydacji FAs w sercu myszy SCD4^{-/-}.



Ryc. 27. Proces β-oksydacji kwasów tłuszczowych w sercu myszy SCD4^{-/-}. (**A**) Reprezentatywne immunobloty białek zaangażowanych w proces β-oksydacji FAs: PPARα, receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów α; PGC-1α, koaktywator receptora PPAR γ typu 1 α; AMPK, białkowa kinaza aktywowana przez AMP; pAMPK, ufosforylowana AMPK; ACC, karboksylaza acetylo-CoA; pACC, ufosforylowana ACC; CPT1, acylotransferaza karnitynowa 1; VLCAD, dehydrogenaza acylo-CoA bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych; UCP3, białko rozprzęgające 3; (**B**) wyniki analizy densytometrycznej; (**C**) znormalizowana liczba zliczeń cząsteczek mRNA genów białek β-oksydacji: *Ppargc1a*, koaktywator receptora PPAR γ typu 1 α; *Cpt1a*, acylotransferaza karnitynowa 1a; *Acadl*, dehydrogenaza acylo-CoA długołańcuchowych kwasów tłuszczowych; *Hadh*, dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-CoA; *Acat1*, acetylo-CoA acylotransferaza/tiolaza; (**D**) poziom fosforylacji pAMPK i pACC. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n ≥ 10 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4-/- chow.

6.2.6. Transport kwasów tłuszczowych do kardiomiocytów

Kolejnym szlakiem mającym wpływ na zawartość lipidów jest transport FAs do wnętrza komórki. Z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz narzędzi programu ImageJ do analizy poziomu fluorescencji zmierzona została zawartość białka CD36 w tkankach barwionych immunofluorescencyjnie. Serca myszy obu genotypów karmionych paszą HFD wykazywały tendencję wzrostową zawartości CD36 w porównaniu do odpowiednich grup chow (Ryc. 28A,B). W mięśniu sercowym w grupach SCD4^{-/-} chow i SCD4^{-/-} HFD poziom CD36 nie różnił się od grup WT chow i WT HFD. Liczba cząsteczek mRNA genów *Cd36*,

Slc27a1 i *Fabp5* była wyższa u myszy WT HFD i SCD4^{-/-} HFD, w odniesieniu do odpowiednich grup chow, a dodatkowo w grupie SCD4^{-/-} HFD było więcej *Fabp5* niż w grupie WT HFD (Ryc. 28C). Wyniki te pokazują, że, w sercu myszy obu genotypów na diecie chow zawartość transporterów FAs była na podobnym poziomie, a w warunkach HFD nastąpił jej wzrost.



Ryc. 28. Zawartość transporterów kwasów tłuszczowych w sercu myszy SCD4^{-/-}. (**A**) Reprezentatywne zdjęcia lewej komory serca barwionej immunofluorescencyjnie przeciwciałem anty-CD36 (kolor zielony) oraz barwnikiem specyficznym dla jąder komórkowych (kolor niebieski), skala wskazuje 40 µm; (**B**) wyniki analizy poziomu fluorescencji przeciwciała anty-CD36; (**C**) znormalizowana liczba zliczeń cząsteczek mRNA genów białek transportu kwasów tłuszczowych: *Cd36*, translokaza kwasów tłuszczowych; *Slc27a1*, białko transportujące kwasy tłuszczowe 1; *Fabp5*, białko wiążące kwas tłuszczowy 5. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; (A,B) n = 3 myszy/grupa, (C) n ≥ 10 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4-/- chow.

6.3. Wpływ wyciszenia Scd4 na szlak metabolizmu glukozy

Wykorzystanie FAs jako substratu energetycznego powoduje spadek utylizacji glukozy (tzw. cykl Randle'a) (Randle i in. 1963), w związku z tym dokonano analizy szlaku metabolizmu glukozy. W sercu myszy obu genotypów karmionych paszą HFD doszło do spadku zawartości białek pAKT(T308) i GLUT4 (Ryc. 29A,B) oraz liczby cząsteczek mRNA genów: *Slc2a1, Hk1, Eno3, Ldhb* natomiast wzrostu liczby cząsteczek mRNA *Pdk4* (Ryc. 29C) względem odpowiednich grup chow. W sercu myszy grupy SCD4^{-/-} HFD zawartość PI3K(p110α), pAKT1(S473) była niższa (Ryc. 29A,B) w porównaniu do grupy SCD4^{-/-} chow. W grupie WT HFD, ale nie SCD4^{-/-} HFD, zawartość AKT1 była wyższa w porównaniu do właściwych grup chow. Serca myszy grupy SCD4^{-/-} chow, w odniesieniu do serc myszy WT chow, charakteryzowały się niższą zawartością PI3K(p110α), pAKT1(S473), pAKT1(T308), pAS160 oraz GLUT4 (Ryc. 29A,B). Poziom fosforylacji AKT1 w pozycji S473 oraz T308 był niższy w sercu myszy obu genotypów karmionych paszą HFD w odniesieniu do odpowiednich grup chow (Ryc. 29D). W grupie SCD4^{-/-} chow poziom fosforylacji AKT1(S473), AKT1(T308) i pAS160 był niższy w odniesieniu do grupy WT chow (Ryc. 29D).

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują na zahamowany metabolizm glukozy w sercu myszy WT i SCD4^{-/-} w warunkach HFD, a ponadto obniżony metabolizm glukozy w sercu myszy SCD4^{-/-} chow względem myszy WT chow.



Ryc. 29. Szlak metabolizmu glukozy w sercu myszy SCD4^{-/-}. (**A**) Reprezentatywne immunobloty białek zaangażowanych w metabolizm glukozy: PI3K(p110α), podjednostka 110α kinazy 3-fosfatydyloinozytolu; AKT1, kinaza białkowa B; pAKT1(S473), AKT1 z fosforylacją w pozycji S473; pAKT1(T308), AKT1 z fosforylacją w pozycji T308; AS160, substrat białkowy 160 kDa dla kinazy AKT; pAS160, ufosforylowany substrat białkowy 160 kDa dla kinazy AKT; GLUT4, transporter glukozy typu 4; (**B**) wyniki analizy densytometrycznej; (**C**) znormalizowana liczba zliczeń cząsteczek mRNA genów białek metabolizmu glukozy: *Slc2a1*, transporter

glukozy typu 1; *Slc2a8*, transporter glukozy typu 8; *Hk1*, heksokinaza; *Eno3*, enolaza; *Pdk4*, kinaza dehydrogenazy pirogronianowej 4; *Ldhb*, dehydrogenaza mleczanowa; (**D**) poziom fosforylacji pAKT1 i pAS160. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; n \geq 10 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4-/- chow.

6.4. Wpływ wyciszenia *Scd4* na aktywność mitochondriów i poziom ROS w sercu

6.4.1. Liczba mitochondriów

Zwiększona β-oksydacja FAs może wpływać na zmiany strukturalne w mitochondriach, dlatego też przeprowadzono analizy mające na celu ocenić aktywność i morfologię tych organelli. Analiza zdjęć lewej komory serca wykonanych przy pomocy TEM wykazała wzrost o 26 % średniej powierzchni pojedynczego mitochondrium w sercu myszy WT HFD w porównaniu do grupy WT chow (Ryc. 30A,B). Średni rozmiar mitochondrium mięśnia sercowego myszy SCD4^{-/-} chow i HFD nie różnił się od grupy WT chow (Ryc. 30A,B). Liczba mitochondriów przypadająca na jednostkę powierzchni tkanki była podobna w sercu myszy grupy SCD4^{-/-} chow i SCD4^{-/-} HFD względem odpowiednich grup kontrolnych WT (Ryc. 30A,C). Procentowy udział mitochondriów w powierzchni tkanki nie różnił się pomiędzy grupami SCD4^{-/-} chow i WT chow, natomiast w warunkach HFD wyniósł 43 % w grupie WT i 38 % w grupie SCD4^{-/-} (Ryc. 30D).

Podsumowując, dieta HFD spowodowała przerost mitochondriów w sercu myszy WT, natomiast u myszy pozbawionych SCD4 w tych samych warunkach nie stwierdzono takiego efektu.



Ryc. 30. Analiza mitochondriów mięśnia sercowego za pomocą mikroskopii elektronowej (TEM). (A) Reprezentatywne zdjęcia mitochondriów (kolor żółty) w przekroju poprzecznym lewej komory serca, skala wskazuje 2 µm; (B) średnia powierzchnia pojedynczego mitochondrium; (C) liczba mitochondriów przypadająca na jednostkę powierzchni tkanki; (D) procent powierzchni tkanki zajęty przez mitochondria. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; (B) n < 380 mitochondriów, (C,D) n = 3 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.4.2. Szlak selektywnej degradacji mitochondriów (mitofagia)

Mitofagia współdziałając z procesem podziału mitochondriów, wpływa na rozmiar tych organelli (Atici i in. 2023), dlatego w następnym etapie badań dokonano analizy wpływu zahamowania ekspresji *Scd4* na rozmiar mitochondriów i na szlak selektywnej degradacji mitochondriów. Zawartość białek szlaku mitofagii: LC3B, LAMP1, NRF1, Parkin była niższa w sercu myszy WT HFD, a w sercu myszy SCD4^{-/-} HFD wyższa w porównaniu do odpowiednich grup chow (Ryc. 31A,B). Zawartość KEAP1, odpowiedzialnego za degradację NRF2, była wyższa u myszy obu genotypów w warunkach HFD. W sercu myszy grupy SCD4^{-/-} chow w porównaniu do WT chow, była wyższa zawartość białek autofagii, tj. LAMP1, NRF1, Parkin, oraz białka TFAM regulującego transkrypcję mitochondrialnego DNA (Ryc. 31A,B). Nie stwierdzono różnic w liczbie cząsteczek mRNA: *Sqstm1, Map11c3b, Keap1, Nrf1, Prkn, Tfam* (Ryc. 31C). Spośród genów zaangażowanych w proces fuzji mitochondriów – *Mfn1, Mfn2, Opa1* – tylko ostatni z nich miał wyższą ekspresję u myszy WT HFD w porównaniu do zdrowych myszy WT chow, pozostałe geny wykazywały tendencję wzrostową (Ryc. 31D). W pozostałych grupach nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji tych genów. Wyniki te wskazują na obniżony proces mitofagii w sercu myszy WT HFD w odniesieniu do grupy WT

chow, natomiast wzmożoną mitofagię w sercu myszy SCD4^{-/-} HFD w porównaniu do SCD4^{-/-} chow.



Ryc. 31. Szlak mitofagii w sercu myszy SCD4^{-/-}. (A) Reprezentatywne immunobloty białek zaangażowanych w proces mitofagii: LC3B, lekki łańcuch 3B białek 1A/1B związanych z mikrotubulami; LAMP1, białko membrany lizosomu 1; KEAP1, białko wiążące jądrowy czynnik oddechowy 2; NRF1, jądrowy czynnik oddechowy 1; Parkin; TFAM, mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A; (B) wyniki analizy densytometrycznej; (C) znormalizowana liczba zliczeń cząsteczek mRNA genów białek szlaku mitofagii: *Sqstm1*, białko p62 wiążące

się z ubikwityną; *Map1lc3b*, lekki łańcuch 3B białek 1A/1B związanych z mikrotubulami; *Keap1*, białko wiążące jądrowy czynnik oddechowy 2; *Nrf1*, jądrowy czynnik oddechowy 1; *Prkn*, parkin; *Tfam*, mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A; (**D**) względna ekspresja genów: *Mfn1*, mitofuzyna 1; *Mfn2*, mitofuzyna 2; *Opa1*, GTPaza podobna do dynaminy; *Drp1*, białko podobne do dynaminy-1; *Fis1*, białko podziału mitochondriów. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; n \geq 10 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4-/- chow.

6.4.3. Łańcuch transportu elektronów (fosforylacja oksydacyjna)

W celu sprawdzenia czy zmiany w rozmiarze mitochondriów oraz w szlaku ich selektywnej degradacji wpłynęły na aktywność ETC, przeanalizowano szlak fosforylacji oksydacyjnej. Zawartość mitochondrialnych białek fosforylacji oksydacyjnej tj. syntazy ATP, oksydazy cytochromu c (kompleks IV), oksydoreduktazy koenzym Q-cytochrom c (kompleks III), dehydrogenazy bursztynianowej (kompleks II) i dehydrogenazy NADH (kompleks I) była podwyższona w sercu myszy WT HFD w porównaniu do WT chow. Natomiast w sercu myszy z grupy SCD4^{-/-} HFD względem SCD4^{-/-} chow stwierdzono wyższy poziom jedynie syntazy ATP i kompleksu IV (Ryc. 32A,B). W mięśniu sercowym myszy z grupy SCD4-/- chow w porównaniu do WT chow zawartość syntazy ATP była wyższa, a kompleksów I, II oraz III niższa. Ponadto w grupie SCD4^{-/-} HFD względem grupy WT HFD była niższa zawartość większości białek, oprócz kompleksu IV (Ryc. 32A,B). Względna ekspresja genu Ndufv2, kodującego podjednostkę rdzenia dehydrogenazy NADH była wyższa w sercu myszy WT HFD, ale nie SCD4^{-/-} HFD, w porównaniu do WT chow i SCD4^{-/-} chow, odpowiednio (Ryc. 32C). Analiza aktywności dehydrogenazy NADH wykazała podwyższoną aktywność kompleksu I u myszy WT HFD i SCD4^{-/-} HFD, natomiast w grupie SCD4^{-/-} HFD była ona niższa niż w grupie WT HFD (Ryc. 32D,E).

Wyniki te pokazują, że w mięśniu sercowym myszy WT HFD, ale nie SCD4^{-/-} HFD, w porównaniu do odpowiednich grup chow była wyższa względna ekspresja *Ndufv2* oraz zawartość białka kompleksu I, II i III. W sercu myszy obu genotypów w warunkach HFD wzrosła aktywność dehydrogenazy NADH względem odpowiednich grup chow, jednak w grupie SCD4^{-/-} HFD aktywność była niższa niż w WT HFD. Może to świadczyć o wzmożonej aktywności całego łańcucha transportu elektronów i syntazy ATP w sercu myszy WT karmionych paszą HFD, a u myszy SCD4^{-/-} tylko ostatniego białka kompleksu ETC oraz syntazy ATP.



Ryc. 32. Mitochondrialny kompleks białek fosforylacji oksydacyjnej w sercu myszy. (A) Reprezentatywne immunobloty białek syntazy ATP oraz łańcucha transportu elektronów (ETC): kompleks I, dehydrogenaza NADH; kompleks II, dehydrogenaza bursztynianowa; kompleks III, oksydoreduktaza koenzym Q–cytochrom c; kompleks IV, oksydaza cytochromu c; (B) wyniki analizy densytometrycznej; (C) względna ekspresja genu podjednostki rdzenia dehydrogenazy NADH (*Ndufv2*); (D) Reprezentatywne zdjęcia ściany lewej komory serca barwionej zależnie od aktywności dehydrogenazy NADH, wykonane z wykorzystaniem obiektywu o 20-krotnym powiększeniu, skala wskazuje 40 µm; (E) wynik analizy gęstości optycznej. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD; (A-C) n \geq 10 myszy/grupa, (D,E) n = 3 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.4.4. Poziom ROS

Wzmożona aktywność mitochondriów, a dokładniej dehydrogenazy NADH jest istotnym źródłem ROS (Zhao i in. 2019). Analiza zdjęć mikroskopowych tkanki sercowej barwionej fluorescencyjnym czynnikiem czułym na ROS wykazała ich podwyższony poziom u myszy obu genotypów w warunkach HFD, w porównaniu do odpowiednich grup chow. W sercu myszy SCD4^{-/-} HFD zawartość ROS była niższa niż u myszy z grupy WT HFD (Ryc. 33A,B).



Ryc. 33. Wpływ wyciszenia SCD4 na zawartość reaktywnych form tlenu (ROS) w lewej komorze serca myszy. (A) Reprezentatywne zdjęcia wybarwionych ROS (kolor czerwony) w preparatach mięśnia sercowego wykonane z wykorzystaniem obiektywu o 10-krotnym powiększeniu, skala wskazuje 80 μ m; (B) wynik pomiaru intensywności fluorescencji. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n = 3 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4^{-/-} chow.

6.5. Łańcuch transportu elektronów w komórkach HL-1 z wyciszoną ekspresją *Scd4*

W celu potwierdzenia uzyskanych w modelu *in vivo* rezultatów, użyto komórek HL-1 z wyciszoną ekspresją *Scd4*, które dodatkowo traktowano 18:0. W komórkach grupy non-targ 18:0, ale nie siSCD4 18:0, stwierdzono wzrost zawartości białek oksydazy cytochromu c (kompleks IV), oksydoreduktazy koenzym Q–cytochrom c (kompleks III) i dehydrogenazy bursztynianowej (kompleks II) w porównaniu do odpowiednich grup traktowanych BSA. Zawartość dehydrogenazy NADH (kompleks I) była wyższa w grupach non-targ i siSCD4 w warunkach traktowania 18:0, w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych traktowanych BSA (Ryc. 34A,B). Komórki z grupy siSCD4 traktowane zarówno 18:0 i BSA miały niższy poziom białek kompleksu I i II niż komórki kontrolne w tych samych warunkach. Traktowanie komórek HL-1 18:0 aktywowało dehydrogenazę NADH (kompleksu I) w grupach non-targ i siSCD4, względem odpowiednich grup traktowanych BSA. Jednak w grupie siSCD4 18:0 aktywność enzymatyczna była niższa niż w komórkach grupy non-targ 18:0 (Ryc. 34C,D). Wyniki te sugerują aktywację mitochondrialnego ETC, a szczególnie kompleksu I

odpowiedzialnego za produkcję ROS, w warunkach traktowania 18:0. Wyciszenie ekspresji *Scd4* hamuje efekt wywołany działaniem 18:0.



Ryc. 34. Mitochondrialny kompleks białek fosforylacji oksydacyjnej w komórkach HL-1 z wyciszoną ekspresją *Scd4.* (A) Reprezentatywne immunobloty białek syntazy ATP oraz łańcucha transportu elektronów (ETC): kompleks I, dehydrogenaza NADH; kompleks II, dehydrogenaza bursztynianowa; kompleks III, oksydoreduktaza koenzym Q–cytochrom c; kompleks IV, oksydaza cytochromu c; (B) wyniki analizy densytometrycznej; (C) reprezentatywne zdjęcia komórek HL-1 barwionych błękitem nitrotetrazolowym (NBT), zależnie od aktywności dehydrogenazy NADH, wykonane z wykorzystaniem obiektywu o 20-krotnym powiększeniu, skala wskazuje 40 μ m; (D) wynik analizy gęstości optycznej. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; (A,B) n = 3 niezależne eksperymenty, (C,D) n = 300 komórek; a – p < 0,05 vs. non-targ BSA; b – p < 0,05 vs. non-targ 18:0; c – p < 0,05 vs. siSCD4 BSA.

6.6. Wpływ wyciszenia *Scd4* na gospodarkę jonów wapnia w kardiomiocytach

6.6.1. Zawartość białek regulujących równowagę wapniową w sercu myszy

Jony wapnia wpływają na regulację szlaków lipolizy (Zhang i in. 2021), lipogenezy Zemel 2003), β-oksydacji FAs (Georgiou i in. 2015) oraz strukturę i aktywność mitochondriów (Lai i Qui 2020). W związku z zaobserwowanymi zmianami w wymienionych szlakach,

przeanalizowano szlak homeostazy Ca²⁺, które pośrednio wpływają na wymienione ścieżki sygnałowe.

W sercu myszy WT i SCD4^{-/-} karmionych paszą HFD spadła zawartość mRNA genu białka wiążącego wapń *S100a1* (Ryc. 35A). Analiza Western Blot wykazała spadek zawartości białek PKA, CaMKIIô oraz SERCA2a, z jednoczesnym wzrostem obu form PLN (aktywnej monomerycznej i nieaktywnej ufosforylowanej pentamerycznej) i zachowaniem stosunku pPLN/mPLN w sercu myszy WT HFD w porównaniu do grupy WT chow (Ryc. 35A,B). W sercu myszy SCD4^{-/-} efekt HFD względem grupy SCD4^{-/-} chow był częściowo odwrotny – zawartość białek CaMKIIô i SERCA2a wzrosła, natomiast PKA się nie zmieniła. W grupie SCD4^{-/-} chow stwierdzono wyższy poziom białka PKA, mPLN, pPLN, stosunku pPLN/mPLN i SERCA2a, natomiast niższy CaMKIIô względem grupy WT chow (Ryc. 35A,B). Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w zawartości białka RyR w sercu myszy pozbawionych SCD4 z grup chow i HFD względem odpowiednich grup WT (Ryc. 35A,B).

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują na zaburzoną równowagę wapniową w sercu myszy z grupy WT HFD oraz aktywację białek zaangażowanych w regulację homeostazy wapnia w sercu myszy grupy SCD4^{-/-} HFD względem odpowiednich grup chow.



Ryc. 35. Gospodarka jonów Ca²⁺ w sercu myszy WT i SCD4^{-/-}. (A) Znormalizowana liczba zliczeń cząsteczek mRNA genu białka wiążącego wapń *S100a1*; (B) reprezentatywne immunobloty białek szlaku transportu Ca²⁺ do siateczki śródplazmatycznej: PKA, kinaza białkowa A; CaMKII\delta, kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny typu II; PLN, fosfolamban forma monomeryczna (mPLN) i pentameryczna (pPLN); SERCA2a, sarkoplazmatyczna Ca²⁺-ATPazę typu 2; RyR, kanał rianodynowy; (C) wyniki analizy densytometrycznej. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n \geq 10 myszy/grupa; a – p < 0,05 vs. WT chow; b – p < 0,05 vs. WT HFD; c – p < 0,05 vs. SCD4-/- chow.

6.6.2. Zawartość białek regulujących równowagę wapniową i wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia w komórkach HL-1

W celu określenia czy zmiany w szlaku homeostazy Ca²⁺ wpływają na zawartość Ca²⁺ w kardiomiocytach wykorzystano model *in vitro*. Analiza intensywności fluorescencji barwnika zależnego od obecności Ca²⁺ wykazała 37 % wyższy poziom tych jonów w komórkach HL-1 siSCD4 (Ryc. 36A). Inkubacja komórek HL-1 non-targ z 18:0 spowodowała wzrost zawartości mPLN względem komórek kontrolnych hodowanych w obecności BSA. Zawartość białka PKA była niższa w grupie siSCD4 18:0 względem grupy non-targ 18:0 (Ryc. 36B,C). Wyższą zawartością białka RyR charakteryzowały się komórki HL-1 siSCD4 18:0 oraz HL-1 non-targ 18:0 w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normalnych (BSA), także siSCD4 BSA względem non-targ BSA (Ryc. 36B,C).

Reasumując, wyniki uzyskane *in vitro* potwierdziły wpływ obniżonej ekspresji *Scd4* na białka szlaku homeostazy Ca²⁺. Zmianom w zawartości ww. białek towarzyszył zwiększony poziom Ca²⁺ w kardiomiocytach.



Ryc. 36. Zawartość białek zaangażowanych w gospodarkę jonów wapnia Ca²⁺. (A) Pomiar zawartości Ca²⁺ w komórkach HL-1 z obniżoną ekspresją *Scd4*; (**B**) reprezentatywne immunobloty białek szlaku transportu Ca²⁺ do siateczki śródplazmatycznej: PKA, kinaza białkowa A; mPLN, fosfolamban forma monomeryczna; RyR, kanał rianodynowy; (**C**) wyniki analizy densytometrycznej. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD; n = 3 niezależne eksperymenty; a – p < 0,05 vs. non-targ BSA; b – p < 0,05 vs. non-targ 18:0; c – p < 0,05 vs. siSCD4 BSA.

7. Dyskusja

Dotychczasowe dane literaturowe przedstawiają białko SCD4 jako izoformę specyficzną dla serca myszy, przy czym obecność mRNA została sprawdzona dla tkanek: serca, mózgu, śledziony, płuc, wątroby, mięśni szkieletowych, nerek oraz jąder (Miyazaki i in. 2003). Wyniki opisane w niniejszej pracy przedstawiają nowo poznane funkcje SCD4 w regulacji metabolizmu myszy, ze szczególnym uwzględnieniem serca. Wykazane zmiany masy ciała, jego stłuszczenia, poziomu glukozy, insuliny i cholesterolu w osoczu oraz współczynnika HOMA-IR u zwierząt SCD4^{-/-} sugerują, iż *Scd4* może ulegać ekspresji również w innych narządach mających wpływ na wymienione parametry np. w trzustce lub jelitach.

Brak ekspresji Scd4 wpływa na regulację masy oraz stłuszczenia ciała. Myszy SCD4^{-/-} w porównaniu do myszy WT, charakteryzowały się niższą masą ciała na początku eksperymentu. Może to być spowodowane m.in. niższą masą tkanki tłuszczowej w całym ciele, która w warunkach standardowych wynosi ok. 3,5 g, co stanowi ok. 16 % masy ciała, a warunkach otyłości nawet 37 % masy ciała (14,6 g) (Kaiyala i in. 2010). W obecnej pracy odnotowano niższa o 13 % mase trzewnej tkanki tłuszczowej u myszy SCD4-/- chow w porównaniu do myszy WT chow. Natomiast myszy SCD4-/- HFD zakumulowały 57 % mniej tłuszczu trzewnego niż myszy z grupy WT HFD, co wskazuje, że obniżony przyrost masy ciała w dużej mierze był spowodowany niższym stłuszczeniem ciała myszy SCD4^{-/-}. Badania z wykorzystaniem myszy SCD1_{GKO} (Ntambi i in. 2002), SCD2^{-/-} (O'Neill i in. 2020) oraz DGAT1^{-/-} (Chen i in. 2002a, Chen i in. 2002b) wykazały, że zwierzęta te mają zwiększony tzw. "wydatek energetyczny" na skutek większej wrażliwości tkanek obwodowych na leptynę (Chen i in. 2002b), podwyższoną niezależnie od PPARa ekspresję genów termoregulacji w watrobie i brązowej tkance tłuszczowej (Miyazaki i in. 2004) lub zmian w zawartości kwasów 16:1 i 18:1, będących cząsteczkami sygnałowymi w podwzgórzu, gdzie znajduje się ośrodek sytości i głodu (de Moura i in. 2016). W niniejszej pracy "wydatek energetyczny" nie był badany, jednak może to być przyczyna spadku masy ciała oraz jej niższego przyrostu w warunkach HFD u zwierząt SCD4^{-/-}.

Brak SCD1, zarówno w całym organizmie jak i w samej skórze, chroni myszy przed otyłością i insulinoopornością, sugerując obecność wzajemnych zależności (ang. cross-talk) między różnymi tkankami w odpowiedzi metabolicznej (Miyazaki i in. 2009, Sampath i in. 2009, Burchat i in. 2022). Badania przeprowadzone przez Burchat i wsp. (2022) wykazały obniżenie ekspresji genów lipogenezy w wątrobie myszy SCD1_{IKO} w warunkach HCD, co jednak nie przełożyło się na niższy poziom lipidów we wspomnianej tkance, natomiast obniżyło poziom TG wosoczu. Zmniejszone wchłanianie treści pokarmowej w przewodzie pokarmowym chroni przed otyłością wywołaną dietą, a mechanizm ten jest celem interwencji farmakologicznych (Wit i in. 2022). Istotną rolę w przekazywaniu tłuszczy do krwioobiegu pełnią komórki jelita – enterocyty (Torelli i in. 2019), a szczególnie białka szlaku lipogenezy, m.in. MGAT (Nelson i in. 2014), DGAT (Hung i in. 2017), ACAT (Zhang i in. 2012) oraz SCD1 (Burchat i in. 2022), zaangażowane w estryfikację pobranych FAs i syntezę chylomikronów. Badania z wykorzystaniem myszy pozbawionych wspomnianych enzymów w jelicie, za wyjątkiem SCD1_{IKO}, wykazały, że zwierzęta te nie rozwijają otyłości wywołanej dieta (Zhang i in. 2012, Nelson i in. 2014, Hung i in. 2017, Burchat i in. 2022). W warunkach HFD dochodzi do zwiększenia ekspresji genów kodujących białka lipogenezy (MGAT, DGAT,
GPAT) w jelicie, zwiększonej absorpcji tłuszczy i estryfikacji FAs w enterocytach (Luo i in. 2018). Ponieważ ekspresja *Scd4* nie była badana w jelicie, możliwe jest, że *Scd4* ulega ekspresji w tym narządzie. W takim wypadku, usunięcie SCD4 w całym organizmie potencjalnie może obniżać ekspresję innych enzymów szlaku lipogenezy w enterocytach, jak to zostało udowodnione dla SCD1 (Burchat i in. 2022), i poprzez obniżenie poziomu CE w osoczu myszy SCD4^{-/-} przyczyniać się do niższego stłuszczenia ciała. Dalsze badania nad wpływem braku SCD4 na funkcje jelit mogą wykazać, czy *Scd4* ulega ekspresji w tej tkance oraz, jeśli tak, jaka jest jego funkcja w absorbcji tłuszczów i przekazywaniu ich do krwioobiegu.

Podwyższony poziom glukozy, insuliny, cholesterolu oraz rozwój insulinooporności są efektem otyłości w mysich modelach tej choroby, m.in. myszy ob/ob (Dobrzyn i in. 2010; Suriano i in. 2021), myszy db/db (Suriano i in. 2019, Lu i in. 2021) lub otyłości wywołanej dietą (Burchfield i in. 2018, Li i in. 2020, Xu i in. 2022). Zahamowanie ekspresji genów zaangażowanych w lipogenezę, takich jak Scd1, Scd2, Dgat1, pozytywnie wpływa na wrażliwość na insulinę, poziom glukozy i lipidów w osoczu (Ntambi i in. 2002, Chen i in. 2002a, Chen i in. 2002b, Dobrzyn i in. 2008, O'Neill i in. 2020). Otyłe myszy w warunkach HFD lub db/db, ale nie ob/ob, pozbawione SCD1, mają niższy poziom glukozy, insuliny, TG i cholesterolu we krwi, a także prawidłową odpowiedź organizmu w teście tolerancji glukozy (Flowers i in. 2007, Miyazaki i in. 2009, Dobrzyn i in. 2010). U myszy ob/ob usunięcie SCD1 obniżyło masę oraz zawartość TG w wątrobie (Flowers i in. 2007, Miyazaki i in. 2009). W niniejszej pracy wykazano, że w warunkach HFD zahamowanie ekspresji Scd4 zachowało poziom glukozy na czczo, a także częściowo zapobiegło podwyższeniu poziomu insuliny i cholesterolu w porównaniu do grupy WT HFD. W przeciwieństwie do innych badań z wykorzystaniem mysiego modelu otyłości wywołanej HFD, w obecnej pracy nie zaobserwowano różnic w poziomie TG i FFA u zwierzat obu genotypów w warunkach HFD względem odpowiednich grup chow, czego przyczyną może być krótszy czas trwania eksperymentu niż w przytoczonych pracach (Miyazaki i in. 2009, Xu i in. 2022). W badaniach z wykorzystaniem 16-tygodniowej diety wzrost FFA i TG jest już zauważalny w grupach karmionych HFD (Sun i in. 2020).

Poza TG "nośnikiem" FAs we krwi wewnątrz lipoprotein są CE (Ko i in. 2020). W osoczu myszy zawartość CE jest 3-krotnie wyższa od wolnego cholesterolu (Subbaiah i in. 2012). Można więc przypuszczać, że niższy poziom stłuszczenia ciała myszy SCD4^{-/-}, pomimo braku różnic w zawartości TG w osoczu, wynika z niższej zawartości CE, w związku z zaobserwowanym niższym poziomem całkowitego cholesterolu w osoczu. Taki wniosek jednak wymaga bezpośredniego potwierdzenia przy użyciu osobnych testów na CE oraz całkowity cholesterol. Obniżony poziom cholesterolu, w tym jego estrów w osoczu, opisano dla myszy pozbawionych SCD1 (Flowers i in. 2006), a także w innych badaniach, gdzie jednak nie zostało sprecyzowane, czy na zbadany cholesterol składały się jego estry, czy tylko forma wolna (Dobrzyn i in. 2008, MacDonald i in. 2008, Dobrzyn i in. 2010). Mechanizm tych zmian obejmuje m.in. spadek poziomu lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL, ang. high-density lipoprotein) (Flowers i in. 2006), niezależnie od aktywności SCD1 w watrobie, ponieważ brak SCD1 wyłącznie w tym narządzie nie prowadził do obniżenia poziomu cholesterolu (Miyazaki i in. 2007). Współczynnik HOMA-IR, określający wpływ insulinooporności na hiperglikemię na czczo, jest podniesiony u ludzi z insulinoopornością (Matthews i in. 1985) i w różnych zwierzecych modelach otyłości (Sun i in. 2013, Irles i in. 2015, Avtanski i in. 2019), w tym

otyłości wywołanej przez HFD (Nizar i in. 2016). Dzięki swojej prostocie, dokładności i powszechności jest najczęściej stosowanym modelem do pośredniego szacowania insulinooporności (Gutch i in. 2015). HOMA-IR był obniżony u otyłych myszy SCD4^{-/-} względem grupy WT HFD, co sugeruje częściowe zahamowanie przez brak SCD4 negatywnego wpływu HFD na rozwój insulinooporności. Jednak w teście tolerancji glukozy, wynik myszy SCD4^{-/-} nie odbiegał od wyniku myszy WT. Podsumowując wynik testu tolerancji glukozy oraz poziomu glukozy i insuliny na czczo można zasugerować, że myszy SCD4^{-/-} w warunkach spożywania HFD rozwijają tzw. izolowaną upośledzoną tolerancję glukozy (ang. isolated impared glucose tolerance), objawiającą się normalnym poziomem glukozy na czczo, ale zaburzonym wynikiem testu tolerancji glukozy. Przyczyną takiego zaburzenia jest znaczna insulinooporność mięśni i dysfunkcja trzustki, z zachowaną wrażliwością na insulinę wątroby (Nathan i in. 2007, Varghese i in. 2016). Z kolei myszy WT w warunkach HFD rozwijają zarówno upośledzona tolerancje glukozy, jak i zaburzony poziom glukozy na czczo, co oprócz dysfunkcji komórek β trzustki i insulinooporności mięśni, wiąże się z zaawansowaną insulioopornością wątroby (Qiao i in. 2003, Abdul-Ghani i in. 2006). Usunięcie SCD4 pozytywnie wpłyneło na długoterminową odpowiedź organizmu w obniżeniu poziomu glukozy, jednak nie poprawiło odpowiedzi krótkoterminowej (dwugodzinnej) jaka ma miejsce w teście tolerancji glukozy. Wynik ten jest dobrym prognostykiem, ponieważ izolowana upośledzona tolerancja glukozy jest stanem poprzedzającym rozwój T2D, który można odwrócić i dwukrotnie rzadziej prowadzi do rozwoju T2D, niż w połączeniu z zaburzeniem poziomu glukozy na czczo (Liu i in. 2022). Ponadto, niższa wartość HOMA-IR w grupie SCD4⁻ ⁻ HFD może wynikać z poprawionej wrażliwości na insulinę watroby, co sugeruje obecność wzajemnego oddziaływania pomiędzy sercem a wątrobą.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki dostarczyły istotnych informacji dotyczacych wpływu braku SCD4 na magazynowanie tłuszczu i morfologię serca. W przeciwieństwie do myszy pozbawionych SCD1, u których stwierdzono zwiększony stosunek masy serca do masy ciała (Dobrzyn i in. 2008), brak SCD4 w warunkach standardowych (chow) nie wpłynał na wyżej wymieniony współczynnik. Myszy z grupy SCD4^{-/-} HFD, ale nie WT HFD, miały większą masę serca oraz większy stosunek masy serca do długości kości piszczelowej w stosunku do grup chow, co sugeruje przerost serca u zwierząt pozbawionych SCD4. Jednak uwzględniając zachowany stosunek masy serca do masy ciała można uznać, że jest to fizjologiczna adaptacja do zwiększonego zapotrzebowania na dostarczenie krwi w związku z większą masą i objętością ciała myszy SCD4^{-/-} karmionych HFD. U myszy WT doszło do spadku stosunku masy serca do masy ciała w warunkach HFD. Dane literaturowe wskazuja, że większa masa serca dodatnio koreluje z masą ciała u różnych ssaków, w tym myszy (Dawson i in. 2003, Avila i in. 2017). Patologiczna przebudowa serca objawia się m.in. wzrostem zawartości ROS, dysfunkcją mitochondriów, spadkiem mitofagii i zaburzoną homeostazą jonów Ca²⁺ (Nakamura i Sadoshima 2018). Wszystkie wymienione czynniki wystąpiły u zwierząt WT HFD, podczas gdy myszy SCD4-/- HFD miały zachowane lub w istotnie mniejszym stopniu zwiększone wartości tych wskaźników. Rozważania te znajdują swoje potwierdzenie w wynikach echokardiografii, które zostały opisane w dalszej części dyskusji.

Wysoki poziom stłuszczenia ciała przyczynia się do przerostu lewej komory serca, zwłóknienia i dysfunkcji serca (Dobrzyn i in. 2008, Alex i in. 2018,). Serce, jako organ wysoce wyspecjalizowany w ciągłej pracy, wymaga ogromnej ilości ATP, jest jednak

nieprzystosowane do akumulowania energii (Nakamura i Sadoshima 2020), co zostało wykazane na przykładzie otyłych myszy ob/ob (Christoffersen i in. 2003), db/db (Lu i in. 2021) oraz myszy karmionych HFD (Xu i in. 2022). Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że ośmiotygodniowy okres spożywania HFD, jest wystarczający by spowodować akumulację lipidów neutralnych w sercu myszy, a brak SCD4 obniża ich zawartość, przyczyniając się do zmniejszenia powierzchni kropli lipidowych. Badania wskazują, że długość okresu diety HFD ma wpływ na wywołany przez nią efekt na funkcję serca (Calligaris i in. 2013, Tan i in. 2021), a czterotygodniowy okres nie wywołuje zmian funkcji i morfologii serca (Joseph i in. 2019). Na przykładzie mózgu przedstawiono, że 16-tygodniowy okres spożywania HFD, ale nie ośmiotygodniowy, zwiększył ekspresję Scd2 w tym narządzie. Obniżenie ekspresji Scd2 w mózgu myszy w warunkach HFD hamowało przybieranie masy ciała i tkanki tłuszczowej, co wspiera hipotezę o różnych mechanizmach odpowiedzi na rozwój otyłości w zależności od długości trwania eksperymentu (de Moura i in. 2016). W krótkiej ekspozycji na dietę HFD organizm, w celu zachowania prawidłowego dostarczenia krwi do tkanek obwodowych, odpowiada mechanizmami kompensacyjnymi takimi jak aktywacja układu współczulnego oraz renina-angiotensyna-aldosteron, co skutkuje zawężeniem naczyń krwionośnych, podwyższeniem ciśnienia i umiarkowanym przerostem lewej komory serca (Tan i in. 2021). Jednak wraz z przedłużaniem się diety HFD mechanizmy te stają się niewystarczające, a wręcz przyczyniają się do pogłębienia dysfunkcji serca i aktywacji szlaków przeciwstawnych, np. nadprodukcji ANP, peptydu natriuretycznego typu B (ang. B-type natriuretic peptide, BNP), czynnika martwicy nowotworów (ang. tumor necrosis factor a, TNFα), prowadząc do zwłóknienia, apoptozy i HF (Francis i Chu 1994, Mann i Felker 2021). Wyniki echokardiografii opisane w niniejszej pracy wskazują na początkowy etap rozwoju dysfunkcji serca myszy WT, wywołany ośmiotygodniowym spożywaniem HFD. Brak SCD4 w warunkach HFD, poprzez obniżony poziom zakumulowanych w sercu lipidów, hamuje przebudowę i zaburzenia funkcji serca. Jak wykazano w modelu in vitro, zahamowanie ekspresji Scd4 w pierwotnych kardiomiocytach skraca czas relaksacji, a także hamuje wydłużenie tego czasu stymulowane traktowaniem komórek 18:0 (Wolosiewicz i in. 2024), co sugeruje pozytywny wpływ braku SCD4 na rozwój HFpEF, charakteryzującą się zaburzoną funkcją rozkurczową (Mgbemena i in. 2021). U zdrowych myszy SCD4^{-/-} zaobserwowano spadek EDD i EDV, jednak uwzględniając wspomniany wcześniej zachowany stosunek masy serca do masy ciała można zasugerować, że jest to fizjologiczna adaptacja do szczuplejszego fenotypu myszy, a w związku z tym do mniejszego zapotrzebowania na dostarczenie krwi (Nakamura i Sadoshima 2018). Hipotezę tę potwierdza brak różnic w poziomie ekspresji genów Myh6 i Myh7, które są uznawane za markery HF (Krenz i Robbins 2004), brak zmian ekspresji Nppa, kodującego peptyd ANP, oraz spadek Nppb, kodującego peptyd BNP, towarzyszący fizjologicznej przebudowie serca (Nakamura i Sadoshima 2018), a także brak zwłóknienia, które jest oznaką zaawansowanego przerostu lewej komory serca (Zhu i in. 2022), stwierdzony w sercu myszy SCD4^{-/-} w porównaniu z WT. W tym kontekście, zaobserwowany przerost kardiomiocytów myszy obu genotypów w warunkach HFD, można uznać za przystosowanie fizjologiczne (Zhu i in. 2022). Odwrotny efekt stwierdzono w badaniach na myszach SCD1_{GKO}, gdzie odnotowano wzrost EDD i stosunku masy serca do masy ciała, jednak może być to również adaptacja z uwagi na specyficzny fenotyp myszy SCD1_{GKO} wyrażający się niemal zupełnym brakiem futra i podwyższoną aktywnością metaboliczną (Dobrzyn i in. 2008; Binczek i in. 2007; Sampath i in. 2009).

SFA w porównaniu do MUFA są bardziej toksyczne, m.in. z powodu mniejszej podatności na utlenianie i estryfikację (DeLany i in. 2000) oraz usztywnianie błon w związku ze swoimi właściwościami fizykochemicznymi (Hac-Wydro i Wydro 2007). Wśród FAs o największym udziale w diecie HFD są 18:0, 18:1 i 16:0. Wysoka zawartość 18:1 w diecie oraz jego duża podatność na estryfikację najprawdopodobniej przyczyniły się do wzrostu udziału (mol%) 18:1, a także podwyższonego współczynnika desaturacji 18:1/18:0 we frakcji TG w sercu myszy z grup HFD względem chow. Co ciekawe, w obu grupach SCD4^{-/-} (chow i HFD) stwierdzono zwiększony udział (mol%) 18:1 we frakcji TG względem odpowiednich grup WT, ponieważ jego ilość (nmol/g) spadła w mniejszym stopniu niż średni spadek wszystkich badanych FAs. Wynik ten wraz z wnioskami opisanymi w dalszej części Dyskusji sugerują, że dominującym nad SCD4 źródłem 18:1 w TG może być SCD1, co wskazuje na różną funkcję enzymów SCD w kardiomiocytach. Ekspresja *Scd1* nie uległa zmianie w warunkach braku SCD4.

Kwas 18:1 chroni mięsień sercowy przed rozwojem insulinooporności, apoptozą i stanem zapalnym (Perdomo i in. 2015) i mógł przyczynić się do zahamowania zmian wywołanych akumulacją SFA w sercu w warunkach HFD. SFA, takie jak 16:0 i 18:0, wywołują w sercu myszy stan zapalny, zwłóknienie oraz dysfunkcję (Rabkin i Lodhia 2009, Li i in. 2016, Wang i in. 2017), natomiast MUFA, jak np. 18:1, przyczyniają się do zahamowania apoptozy wywołanej ekspozycją na SFA (Rabkin i Lodhia 2009), hamują przebudowę i uszkodzenie mięśnia sercowego wywołane angiotensyną (Liu T i in. 2020) i izoprenaliną (Singh i in. 2020). Wymienione działanie 18:1 najprawdopodobniej wynika z jego zdolności do neutralizowania toksycznych właściwości 16:0, poprzez kierowanie go do estryfikacji w TG (Listenberger i in. 2003). Opisanym zmianom w zawartości MUFA i SFA we frakcji TG towarzyszył spadek procentowej zawartości PUFA, które są istotnym elementem błon komórkowych, są zaangażowane w zmniejszenie stanu zapalnego (Tortosa-Caparrós i in. 2017), zwłóknienia, poziomu ROS, przerostu i dysfunkcji serca (Li i in. 2017, Ganguly i in. 2018). W odniesieniu do literatury przedstawione wyniki sugerują, że wywołane przez HFD zmiany w zawartości SFA, MUFA i PUFA mogły przyczynić się do zmian morfologii i metabolizmu serca myszy WT. Brak SCD4 wywołał podobny efekt, tj. w sercu myszy SCD4^{-/-} chow względem WT chow stwierdzono wyższy poziom inkorporacji MUFA i SFA do TG, kosztem PUFA, jednak skala tego procesu jest kilkukrotnie niższa, przez co sama zmiana zawartości poszczególnych FAs nie miała wpływu na funkcję serca u myszy SCD4^{-/-} chow względem WT chow.

W kontekście opisanych w niniejszej pracy zmian w metabolizmie, większe znaczenie ma brak funkcjonalnego białka SCD4, jego interakcji z innymi enzymami, a także zawartość endogennych produktów tego białka. Dostępne dane literaturowe wskazują, że dla komórki ma ogromne znaczenie pochodzenie FAs: endogenne lub egzogenne (Saddik i Lopaschuk 1991, Miyazaki i in. 2001, Schweitzer i in. 2006, Murphy i in. 2022). Możliwe, iż różne izoformy SCD przetwarzają FAs w różnym celu, tj. SCD1 kieruje produkowane MUFA do estryfikacji, natomiast SCD4 do dalszej desaturacji (Miyazaki i in. 2003, Dobrzyn i in. 2008, Man i in. 2006, Sampath i in. 2009). W badaniach z użyciem myszy z nadekspresją *Dgat1* w sercu wykazano zwiększony poziom mRNA *Scd1* i *Scd2*, ale nie *Scd4* w kardiomiocytach, co sugeruje, że SCD4 nie jest tak ważnym partnerem dla DGAT1 jak pozostałe izoformy SCD, a więc SCD4

syntezując MUFA może brać udział w syntezie PUFA, zamiast kierować MUFA do estryfikacji (Kolwicz i in. 2015). Jednak taka hipoteza wymaga szczegółowych dalszych badań. Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem komórek HL-1 wykazały, że 18:0, będący głównym substratem dla SCD4 (Miyazaki i in. 2006), powoduje magazynowanie lipidów w LDs i wywołuje opisane w dalszej części zmiany w szlakach, m.in. lipolizy, fosforylacji oksydacyjnej i ROS. Kwas 18:1 również prowadził do akumulacji LDs, jednak obniżenie ekspresji *Scd4* w komórkach HL-1 nie wpływało na ten efekt. Brak SCD4 oprócz obniżenia bezwzględnej zawartości 16:0 i 18:0, które jak zostało już opisane wywołują m.in. stan zapalny i dysfunkcję serca (Rabkin i Lodhia 2009, Li i in. 2016, Wang i in. 2017), częściowo zahamował wywołany HFD wzrost procentowego udziału wspomnianych SFA we frakcji TG, co wskazuje na korzystny wpływ usunięcia SCD4 zarówno na zawartość jak i skład lipidów w sercu.

Dostępne w literaturze wyniki analiz transkryptomicznych w sercu i mięśniach szkieletowych myszy karmionych HFD wykazały, że najbardziej zaburzone sa m.in. szlaki PPARα i związana z nimi regulacja metabolizmu FAs, glukozy oraz aktywność mitochondriów (de Wilde i in. 2009, Joseph i in. 2022), co jest zgodne z otrzymanymi w niniejszej pracy wynikami. Zahamowanie ekspresji Scd4 wpłyneło na znacznie mniejszą liczbę szlaków, co sugeruje wysoką precyzję oddziaływania SCD4 ze szlakami sygnałowymi. Jednak zmienione przez brak SCD4 ścieżki sygnałowe były na tyle kluczowe, że wystarczyły do wywarcia opisanych w niniejszej pracy korzystnych efektów na mięsień sercowy. Wiele ze zmienionych przez HFD szlaków zaangażowanych jest w metabolizm glukozy, FAs i aktywność mitochondriów. Za ogromnym znaczeniem FAs i mitochondriów w sercu przemawia fakt, że FAs sa głównym źródłem energii dla serca, do 70 % ATP pochodzi z ich utleniania w mitochondriach (Neely i in. 1972; Lopaschuk i in. 2021, Shi i Qiu 2022), które stanowią jedna trzecia powierzchni kardiomiocytów (Schaper i in. 1985). Nadmierna aktywacja procesu utleniania FAs w większości przypadków prowadzi do zahamowania utleniania glukozy, nadprodukcji ROS i dysfunkcji mitochondriów (Ly i in. 2017, Zhou i Tian 2018, Kumar i in. 2019), jednak są czynniki jak np. brak ACC2, powodujące wzmożone utlenianie FAs w sercu bez wspomnianych negatywnych skutków (Kolwicz i in. 2012, Shao i in. 2020). W niniejszej pracy serca myszy WT HFD oraz SCD4^{-/-} HFD charakteryzowały się zwiększonym poziomem mRNA i białek zaangażowanych w transport FAs do wnętrza komórki, a także ich utleniania w mitochondriach. Ponadto, usunięcie SCD4 zwiększyło ekspresję Fabp5, genu kodującego białko, które zmniejsza toksyczność FAs w cytozolu wiążąc się z nimi i pełniąc w ten sposób funkcję buforowa, w sercu myszy SCD4^{-/-} HFD (Glatz i in. 1997). Sugeruje to większą tolerancję kardiomiocytów SCD4^{-/-} na podwyższone stężenie FAs w cytozolu i wywołaną przez nie lipotoksyczność.

Wykazano, że HFD zwiększa wykorzystanie FAs, a zmniejsza wykorzystanie glukozy jako substratu energetycznego w sercu (Sikder i in. 2018), czemu towarzyszy wzrost ekspresji *Cd36* (Yan i in. 2009), *Cpt1* (Neves i in. 2014), a także *Pdk4* i innych genów zaangażowanych w proces utleniania FAs (Yan i in. 2009, Neves i in. 2014, Joseph i in. 2022). Stymulowana przez otyłość ekspresja *Pdk4* promuje tworzenie połączeń mitochondriów z ER w tzw. MAM, co przyczynia się do obciążenia mitochondriów nadmiarem Ca²⁺ i powoduje dysfunkcję tych organelli (Thoudam i in. 2019). Czterotygodniowy okres spożywania HFD wywołuje w sercu przerost mitochondriów i stres oksydacyjny oraz spadek liczby mitochondriów, podczas gdy myszy nie rozwijają jeszcze otyłości (Joseph i in. 2022). W obecnej pracy myszy WT HFD

Dyskusja

również charakteryzowały się przerostem mitochondriów i zwiększonym stresem oksydacyjnym (wzrost aktywności dehydrogenazy NADH i poziomu ROS), jednak nie stwierdzono u nich spadku liczby mitochondriów w kardiomiocytach względem grupy WT chow. Co ciekawe, w sercu myszy SCD4^{-/-} HFD nie stwierdzono przerostu mitochondriów w porównaniu do SCD4^{-/-} chow, a w odniesieniu do grupy WT HFD aktywność dehydrogenazy NADH była niższa, co przyczyniło się do niższego poziomu ROS. Prawdopodobną przyczyną zahamowania rozwoju dysfunkcji mitochondriów u myszy SCD4^{-/-} HFD jest aktywacja procesu odpowiadającego za ich kontrolę jakości, czyli mitofagię.

Region MAM, w którym występuje białko SCD, jest zaangażowany w proces biogenezy mitochondriów, co sugeruje udział procesu desaturacji w procesie kontroli jakości mitochondriów (Friedman i in. 2011, Elgass i in. 2013). Eksperymenty z wykorzystaniem mysiego modelu otyłości wywołanej dietą potwierdziły, że spadek aktywności mitofagii przyczynia się do dysfunkcji mitochondriów w warunkach zwiększonego utleniania FAs (Shao i in. 2020). Ponadto, aby utlenianie FAs i szlak fosforylacji oksydacyjnej były jak najbardziej optymalne, dystrybucja FAs we wnętrzu mitochondriów musi być równomierna (Rambold i in. 2015). Brak ACC2 w sercu stymulował zależną od białka Parkin mitofagię, zwiększał utlenianie FAs i hamował przebudowę i dysfunkcję serca (Shao i in. 2020). Mimo braku różnic w ekspresji genów i zawartości białek utleniania FAs między myszami SCD4-/- i WT w warunkach HFD, jest możliwe, że aktywność i wydajność tego procesu była wyższa w sercu myszy SCD4-/- HFD, co skutkowało zmniejszonym poziomem lipidów w sercu. Na przykładzie hepatocytów (Liu i in. 2011) oraz mięśni szkieletowych (Imai i in. 2022) wykazano, że tempo β-oksydacji może być podwyższone, pomimo braku zmian w zawartości mRNA lub białek takich jak PGC-1a, PPARa, CPT1, MCAD i LCAD. Ponadto sama morfologia mitochondriów może wpływać na tempo utleniania FAs poprzez regulacje wrażliwości CPT1 na jego inhibitor malonylo-CoA. Wykazano, że większe mitochondria charakteryzują się większą podatnością na inhibicję CPT1 przez malonylo-CoA (Ngo i in. 2023).

Innym możliwym mechanizmem obniżenia zawartości lipidów w sercu jest wydzielenie FAs uwolnionych z LDs w wyniku lipolizy poza komórkę (Schoonderwoerd i Stam 1992, Rambold i in. 2015), co jest drastycznie hamowane w warunkach niedoboru ATGL (Rambold i in. 2015). Kardiomiocyty są zdolne do usuwania lipidów poprzez syntezę i uwalnianie apolipoproteiny B (Nielsen i in. 2002) lub przy udziale mikrosomalnego białka transportującego triacyloglicerole (ang. microsomal triglyceride transfer protein, MTP) (Bartels i in. 2009). Jak zostało wykazane, myszy MTP^{-/-} akumulowały znacznie wiecej tłuszczu w sercu (Bartels i in. 2009), a nadekspresja apolipoproteiny B w sercu obniżała magazynowanie TG (Nielsen i in. 2002, Bartels i in. 2009). Ponadto w badaniu na zdrowych ludziach wykazano, że pośród metabolitów wydzielanych do krwioobiegu przez serce są FAs oraz FAs związane z karnityną, m.in. 16:0 i 18:0, co potwierdza hipotezę o zdolności serca do uwalniania FAs. Co ciekawe pobierana w największym stopniu cząsteczką był 18:1, a na 4. i 10. miejscu 16:0 i 18:0, odpowiednio (Murashige i in. 2020). Zaburzenie równowagi między podziałem i fuzją (ang. fission-fusion) mitochondriów poprzez usunięcie MFN1 lub OPA1 prowadziło zarówno do zwiększonego magazynowania FAs jak i ich wydzielania, wskazując, że mitochondria również wpływaja na uwalnianie FAs poza komórke (Rambold i in. 2015). Mechanizm wydalania FAs z kardiomiocytów nie był badany w obecnej pracy, jednak uwzględniając stwierdzony niższy poziom lipidów, podwyższone tempo lipolizy oraz zachowanie struktury i aktywności mitochondriów w warunkach braku ekspresji *Scd4* możliwe jest, iż FAs uwolnione z LDs oprócz bardziej aktywnego utlenienia w mitochondriach, mogą być wydalane z komórki. Jednak proces ten jest bardzo słabo zbadany.

W sercu większość FAs, które podlegają utlenianiu w mitochondriach jest pochodzenia wewnątrzkomórkowego, z LDs (Saddik i Lopaschuk 1991, Banke i in. 2010, Haemmerle i in. 2011, Carley i in. 2016). W związku z wysoką toksycznością nadmiaru acylokarnityny, polegajaca na obniżeniu potencjału membranowego mitochondriów, dla serca bezpieczniejszym sposobem jest inkorporowanie pobranych FAs do wnętrza LDs, a następnie ich stopniowe uwalnianie w wyniku lipolizy, zamiast bezpośredniej konwersji do związków z acylokarnityną (Roussel i in. 2015, Olzmann i Carvahlo i in. 2019). Wykorzystanie endogennych FAs jako substratu energetycznego przez mięśnie szkieletowe jest kilkukrotnie wyższe niż egzogennych FAs (Tomas i in. 2020), a zatem pobrane z zewnątrz FAs muszą zostać najpierw inkorporowane do wnetrza LDs, aby ulec utlenieniu w mitochondriach (Banke i in. 2010). W sercu myszy obu genotypów w warunkach HFD wzrósł poziom mRNA genów zaangażowanych w transport FAs do wnętrza komórki oraz Dgat2 przeprowadzającego ostatni etap syntezy TG, a w grupie WT HFD dodatkowo spadł poziom białek zaangażowanych w syntezę FAs de novo. Sugeruje to, że FAs zakumulowane w mięśniu sercowym myszy WT HFD są pochodzenia egzogennego, co jest związane z podwyższonym poziomem całkowitego cholesterolu i CE w osoczu. Jak zostało to opisane wcześniej, CE również są nośnikiem FAs w osoczu (Ko i in. 2020), a poziom całkowitego cholesterolu w osoczu myszy SCD4-/- HFD był niższy w porównaniu do WT HFD.

W sercu myszy SCD4^{-/-} HFD zawartość białek syntezy lipogenezy uległa zwiększeniu. W odniesieniu do bardziej aktywnej lipolizy w sercu myszy SCD4^{-/-}, jest prawdopodobne, że w mięśniu sercowym tych myszy dochodzi do zwiększenia tempa obiegu TG, czyli jednocześnie ich syntezy i rozkładu, co jest cechą charakterystyczną dla tego organu (Banke i in. 2010, Wang i in. 2013). W literaturze zwiększony obieg lipidów został opisany jako mający korzystny wpływ polegający na zmniejszeniu stresu wywołanego przez lipidy (Liu i in. 2009, Kolwicz i in. 2015, Roe i in. 2018). Na przykład myszy ze zwiększoną ekspresją Dgat1 w sercu, pomimo zwiększonego magazynowania TG w tym organie, nie miały zaburzeń funkcji serca, co było spowodowane zwiększonym obiegiem TG, chroniącym serce przed stresem niedokrwiennym (Kolwicz i in. 2015). Usunięcie SCD1 lub jego inhibicja w kardiomiocytach skutkuje spadkiem zwartości mRNA i białek zaangażowanych w transport FA i lipogenezę, m.in. CD36, CPT1, SREBP1, FAS, ACC, a także hamuje utlenianie FAs na rzecz większego wykorzystania glukozy (Dobrzyn i in. 2008, Dobrzyn i in. 2010, Bednarski i in. 2016). W sercu myszy SCD1_{GKO}, podobnie jak i SCD4^{-/-}, wykazano wzrost aktywności lipolizy związany między innymi ze spadkiem poziomu G0S2 (Bednarski i in. 2016). Wyniki niniejszej pracy sugerują odmienny mechanizm działania SCD4 niż SCD1 w sercu. SCD4 uczestniczy w syntezie PUFA i wpływa na obieg TG w kardiomiocytach hamując lipogenezę oraz aktywuje utlenianie glukozy, podczas gdy SCD1 uczestniczy głównie w estryfikacji FAs, stymuluje lipogenezę i hamuje wykorzystanie glukozy. Natomiast oba enzymy obniżają aktywność lipolizy i utleniania FAs.

Mysie pierwotne kardiomiocyty SCD4^{-/-} charakteryzowały się zwiększoną aktywnością lipazy ATGL oraz mniejszą liczbą i powierzchnią LDs zakumulowanych w warunkach traktowania 18:0, co potencjalnie może być przyczyną skrócenia czasu relaksacji po skurczu

(Wolosiewicz i in. 2024). Haemmerle i wsp. wykazali, że aktywność ATGL jest wymagana dla prawidłowego funkcjonowania serca, poprzez dostarczanie endogennych lipidowych ligandów dla czynników transkrypcyjnych i w ten sposób wpływa na biogenezę i funkcję mitochondriów (Haemmerle i in. 2011). Pozbawienie kardiomiocytów białka ATGL skutkowało spadkiem wspomnianych ligandów oraz stymulacją syntezy i magazynowania TG, prowadząc do dysfunkcji mitochondriów (Haemmerle i in. 2011), HF, a także do śmierci (Haemmerle i in. 2006). Dla porównania, usunięcie DGAT1 wywołujące poważną dysfunkcję serca w związku z akumulacją DAG i ceramidów, wywołało wzrost ekspresji *Ppara* i *Cd36*, ale nie *Cpt1* (Liu i in. 2014). Z drugiej strony nadekspresja *Dgat1* spowodowała wzmożoną akumulację TG z jednoczesnym wzrostem lipolizy, utleniania FA i zahamowaniem stresu oksydacyjnego (Liu i in. 2009). Usunięcie ACC2, również skutkowało zwiększeniem tempa utleniania FA (Kolwicz i in. 2012), co w połączeniu z przywołanymi wcześniej przykładami wskazuje na odmienny wpływ niedoboru jednego z genów lipogenezy na utlenianie FAs.

Jak już wspomniano, uwolnione w wyniku lipolizy FAs są w większości wykorzystywane do utleniania w mitochondriach (Olzmann i Carvahlo 2020), a brak SCD1 hamuje ten proces, zwiększając utlenianie glukozy (Dobrzyn i in. 2008). W obecnej pracy w sercach myszy obu genotypów HFD spowodował podniesienie poziomu mRNA i białek zaangażowanych w utlenianie FAs, z jednoczesnym spadkiem mRNA i białek metabolizmu glukozy. Zależność ta została opisana w 1963 r. jako tzw. cykl Randle'a, gdzie zwiększenie wykorzystania jednego z substratów energetycznych, glukozy lub FAs, powoduje spadek metabolizmu drugiego z nich (Randle i in. 1963). Zjawisko to jest wykorzystywane do przeciwdziałania negatywnym skutkom nadmiernego wykorzystania FAs jako substratu energetycznego przez serce w warunkach dysfunkcji tego organu związanej z otyłością lub T2D, poprzez stymulacje metabolizmu glukozy (Drosatos i Schulze 2013, Fillmore i in. 2014, Ntambi 2023, Chen i in. 2023b). W przeciwieństwie do SCD1 (Dobrzyn i in. 2008), brak SCD4 obniżył metabolizm glukozy, co zostało udokumentowane spadkiem zawartości mRNA oraz białek zaangażowanych w ten proces. Co ciekawe, przesunięcie metabolizmu w sercach SCD4⁻ ⁻ w kierunku większego wykorzystania FAs jako substratu energetycznego nie wiązało się z dysfunkcja mitochondriów i wzrostem poziomu ROS, za co odpowiadała wzmożona kontrola jakości mitochondriów, czyli mitofagia w sercach myszy SCD4^{-/-}. Obserwacja ta znajduje poparcie w pracach, które przedstawiają, że to nie sam wzrost utleniania FAs wywołuje negatywny efekt w kardiomiocytach, tj. stres oksydacyjny i apoptozę, lecz spadek pojemności oksydacyjnej mitochondriów oraz ich kontroli jakości przez mitofagie, deficyt energetyczny i rozprzęgnięcie procesu glikolizy i utleniania glukozy (Neubauer 2007, Fillmore i in. 2014, Shao i in. 2020). Mechanizm, przez jaki brak SCD4 zachowuje strukturę i funkcje serca w warunkach otyłości wywołanej HFD, obejmuje zmniejszoną akumulację lipidów w mięśniu sercowym poprzez zwiększenie obiegu TG, zwiększone utlenianie i/lub wydalanie FAs uwolnionych z LDs w wyniku lipolizy, z jednoczesnym zachowaniem struktury i funkcji mitochondriów poprzez aktywację mitofagii.

Jony Ca²⁺ są istotnym elementem regulującym m.in. metabolizm lipidów, tj. lipolizę (Zhang i in. 2021), lipogenezę (Zemel 2003), β-oksydację FAs (Georgiou i in. 2015), a także strukturę i aktywność mitochondriów (Lai i Qiu 2020). Wykazano, że w mysim modelu otyłości wywołanej HFD suplementacja Ca²⁺ przyczyniła się do wyższego poziomu Ca²⁺ w cytoplazmie powodując zwiększenie aktywności lipolizy i prowadząc do zmniejszonego stłuszczenia

Dyskusja

wątroby (Zhang i in. 2021), a usunięcie białek zaangażowanych w transport jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki zwiększa poziom zmagazynowanych lipidów oraz hamuje lipolizę w sercu myszy (Maus i in. 2017). Ponadto w warunkach zwiększonego stężenia Ca^{2+} wydajność transportu FAs jest obniżona, pomimo translokacji CD36 na powierzchnię błony komórkowej, co wskazuje na obecność innych procesów mających istotny wpływ na transport FAs (Eyre i in. 2008, Angin i in. 2012). Na przykład sugeruje się, że etap desorpcji FAs jest kluczowy w regulacji transportu FAs do wnętrza komórki (Cheng i in. 2019). Prawdopodobnie w warunkach braku SCD4 transport FAs jest zahamowany w związku z podwyższonym poziomem jonów Ca^{2+} i zaburzeniem procesu desorpcji FAs, pomimo braku zmian w zawartości mRNA i białka CD36, co mogło przyczynić się do niższego poziomu zmagazynowanych lipidów w postaci LDs.

Za gospodarkę Ca²⁺ w większości odpowiada ER razem z mitochondriami (Zhang i in. 2022). Jak zostało udowodnione, SCD znajduje się w błonie ER w miejscu MAM oddziałującym z mitochondriami (Man i in. 2006), a więc potencjalnie SCD może wpływać na gospodarkę Ca²⁺. W obecnej pracy odnotowano wzrost poziomu Ca²⁺ w kardiomiocytach z zahamowaną ekspresją Scd4, co może być przyczyną aktywacji lipolizy. Potencjalny mechanizm, przez jaki Ca²⁺ wpływają na aktywność głównego enzymu lipolizy ATGL, obejmuje wzrost cAMP poprzez aktywację AC, co prowadzi do fosforylacji różnych białek regulujących lipolizę (ATGL, ABHD5, PLIN5) przez kinazę PKA (Dhalla i in. 1977, Schwartz i in. 1993, Zangenberg i in. 2001, Chen i in. 2012, Cerk i in. 2018). Ponadto wyniki niniejszej pracy wskazują na zaburzenia w gospodarce jonów Ca²⁺ w sercu myszy WT HFD, m.in. spadek zawartości białka SERCA2 odpowiedzialnego za wychwyt Ca²⁺ do ER po skurczu, co ma bezpośredni wpływ na czas relaksacji i może powodować dysfunkcję rozkurczową serca. Badania na myszach z indukowanym brakiem SERCA2 potwierdziły rozwój dysfunkcji rozkurczowej serca, a w kardiomiocytach in vitro czas rozluźnienia po skurczu uległ wydłużeniu (Louch i in. 2010). U zwierząt SCD4^{-/-} poziom SERCA2 był zwiększony, co sugeruje, iż zahamowana ekspresja Scd4 chroni serce myszy przed rozwojem dysfunkcji rozkurczowej w warunkach otyłości wywołanej dietą. Rzeczywiście, pierwotne kardiomiocyty SCD4-/- miały krótszy czas relaksacji po skurczu w porównaniu z grupą WT i, w przeciwieństwie do kardiomiocytów WT, czas ten nie ulegał wydłużeniu w warunkach traktowania 18:0 (Wolosiewicz i in. 2024).

Kontynuowanie badań nad SCD4 może pomóc w zrozumieniu kolejnych, niezbadanych mechanizmów, przez które SCD4 wpływa na metabolizm, szczególnie funkcje mitochondriów i gospodarkę jonów Ca²⁺, co może mieć istotne znaczenie dla zrozumienia patogenezy otyłości i chorób metabolicznych.

8. Podsumowanie i wnioski

1. Usunięcie SCD4 u myszy wywiera skutki ogólnoustrojowe, pomimo że dotychczas opisano występowanie SCD4 jedynie w sercu. Wyciszenie ekspresji *Scd4* u myszy zmniejszyło stłuszczenie ciała, hiperinsulinemię i hipercholesterolemię oraz zwiększyło wrażliwość na insulinę u myszy karmionych HFD.

2. Brak SCD4 w warunkach fizjologicznych wywołał niewielkie zmiany w morfologii serca, tj. zmniejszeniu uległy EDD i EDV, natomiast zapobiegł koncentrycznej przebudowie serca w warunkach HFD. Zaangażowane w ten proces mogą być mechanizmy hemodynamiki, na które wpłynął spadek masy i stłuszczenia ciała obniżając obciążenie mięśnia sercowego.

3. Wyciszenie ekspresji *Scd4* obniżyło poziom lipidów zmagazynowanych w kardiomiocytach i nie wpłynęło na ekspresję pozostałych izoform *Scd* (*Scd1*, *Scd2*) w sercu. Niższy poziom lipidów w kardiomiocytach myszy SCD4^{-/-} był związany z aktywacją lipolizy poprzez: 1) zwiększenie poziomu białka ABHD5, które aktywuje lipazę ATGL, z jednoczesnym zachowaniem poziomu jej inhibitora (G0S2); 2) zależną od jonów Ca²⁺ aktywację szlaku sygnałowego AC-PKA-ATGL/PLIN5/ABHD5.

4. Jednoczesna aktywacja lipogenezy, β -oksydacji i lipolizy wskazuje na zwiększoną dynamikę LDs, tj. ich wzrost i redukcję, w sercu myszy SCD4^{-/-} w warunkach HFD, przy czym wyciszenie ekspresji *Scd4* zmniejszyło indukowany przez HFD wzrost LDs w kardiomiocytach. Wyniki te wskazują, że SCD4 jest zaangażowane w regulację metabolizmu energetycznego serca.

5. Spowodowane przez akumulację i toksyczne działanie lipidów przerost mitochondriów i nadprodukcja ROS są zahamowane w kardiomiocytach z wyciszoną ekspresją *Scd4* w warunkach przeciążenia lipidami. Jest to związane ze wzmożeniem procesu kontroli jakości mitochondriów (mitofagii) i spadkiem aktywności dehydrogenazy NADH.

6. SCD4 bierze udział w regulacji homeostazy Ca²⁺ w sercu w warunkach HFD, poprzez wzrost zawartości białek PLN i SERCA2a.

9. Piśmiennictwo

1. Abdalla S, Fu X, Elzahwy SS, Klaetschke K, Streichert T, Quitterer U. Up-regulation of the cardiac lipid metabolism at the onset of heart failure. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2011; 9(3):190-206.

2. Abdul-Ghani MA, Tripathy D, DeFronzo RA. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. Diabetes Care. 2006; 29(5):1130-1139.

3. Abel ED. Insulin signaling in the heart. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2021; 321(1):130-145.

4. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, Wakil SJ. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(34):12011-12016.

5. Actis Dato V, Benitez-Amaro A, Garcia E, Claudi L, Lhoëst MTL, Iborra A, Escola-Gil JC, Guerra JM, Samouillan V, Enrich C, Chiabrando G, Llorente-Cortés V. Targeting cholesteryl ester accumulation in the heart improves cardiac insulin response. Biomed Pharmacother. 2022; 152:113270.

6. Aerni-Flessner L, Abi-Jaoude M, Koenig A, Payne M, Hruz PW. GLUT4, GLUT1, and GLUT8 are the dominant GLUT transcripts expressed in the murine left ventricle. Cardiovasc Diabetol. 2012; 11:63.

7. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; Hational Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Association; World Heart Federation; International Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. Circulation. 2009; 120(16):1640-1645.

8. Alcalai R, Arad M, Wakimoto H, Yadin D, Gorham J, Wang L, Burns E, Maron BJ, Roberts WC, Konno T, Conner DA, Perez-Atayde AR, Seidman JG, Seidman CE. LAMP2 cardiomyopathy: consequences of impaired autophagy in the heart. J Am Heart Assoc. 2021; 10(17):e018829.

9. Alex L, Russo I, Holoborodko V, Frangogiannis NG. Characterization of a mouse model of obesity-related fibrotic cardiomyopathy that recapitulates features of human heart failure with preserved ejection fraction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2018; 315(4):934-949.

10. Aljohani A, Khan MI, Bonneville A, Guo C, Jeffery J, O'Neill L, Syed DN, Lewis SA, Burhans M, Mukhtar H, Ntambi JM. Hepatic stearoyl CoA desaturase 1 deficiency increases glucose uptake in adipose tissue partially through the PGC-1 α -FGF21 axis in mice. J Biol Chem. 2019; 294(51):19475-19485.

11. Andersson L, Drevinge C, Mardani I, Dalen KT, Ståhlman M, Klevstig M, Lundqvist A, Haugen F, Adiels M, Fogelstrand P, Asin-Cayuela J, Hultén LM, Levin M, Ehrenborg E, Lee YK, Kimmel AR, Borén J, Levin MC. Deficiency in perilipin 5 reduces mitochondrial function and membrane depolarization in mouse hearts. Int J Biochem Cell Biol. 2017; 91(Pt A):9-13.

12. Andrejewski N, Punnonen EL, Guhde G, Tanaka Y, Lüllmann-Rauch R, Hartmann D, von Figura K, Saftig P. Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. J Biol Chem. 1999; 274(18):12692-12701.

13. Angin Y, Steinbusch LK, Simons PJ, Greulich S, Hoebers NT, Douma K, van Zandvoort MA, Coumans WA, Wijnen W, Diamant M, Ouwens DM, Glatz JF, Luiken JJ. CD36 inhibition prevents lipid accumulation and contractile dysfunction in rat cardiomyocytes. Biochem J. 2012; 448(1):43-53.

14. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Bassel-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, Spiegelman BM. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. Cell Metab. 2005; 1(4):259-271.

15. Ascenzi F, De Vitis C, Maugeri-Saccà M, Napoli C, Ciliberto G, Mancini R. SCD1, autophagy and cancer: implications for therapy. J Exp Clin Cancer Res. 2021; 40(1):265.

16. Atici AE, Crother TR, Noval Rivas M. Mitochondrial quality control in health and cardiovascular diseases. Front Cell Dev Biol. 2023; 11:1290046.

17. Avila JJ, Kim SK, Massett MP. Differences in exercise capacity and responses to training in 24 inbred mouse strains. Front Physiol. 2017; 8:974.

18. Avtanski D, Pavlov VA, Tracey KJ, Poretsky L. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. Animal Model Exp Med. 2019; 2(4):252-258.

19. Balatskyi VV, Dobrzyn P. Role of stearoyl-CoA desaturase 1 in cardiovascular physiology. Int J Mol Sci. 2023; 24(6):5531.

20. Balatskyi VV, <u>Wolosiewicz M</u>, Dobosz AM, Tracz-Gaszewska Z, Sowka A, Kendziorek M, Krogulec E, Navrulin VO, Dobrzyn P, Effects of cellular lipids on heart in pathology and physiology. [w:] Ntambi JM (ed.), Cellular Lipid in Health and Disease, Academic Press, 2023: 303-337.

21. Baldini SF, Wavelet C, Hainault I, Guinez C, Lefebvre T. The nutrient-dependent O-GlcNAc modification controls the expression of liver fatty acid synthase. J Mol Biol. 2016; 428(16):3295-3304.

22. Banke NH, Wende AR, Leone TC, O'Donnell JM, Abel ED, Kelly DP, Lewandowski ED. Preferential oxidation of triacylglyceride-derived fatty acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPARalpha. Circ Res. 2010; 107(2):233-241.

23. Bartels ED, Nielsen JM, Hellgren LI, Ploug T, Nielsen LB. Cardiac expression of microsomal triglyceride transfer protein is increased in obesity and serves to attenuate cardiac triglyceride accumulation. PLoS One. 2009; 4(4):e5300.

24. Batchuluun B, Pinkosky SL, Steinberg GR. Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2022; 21(4):283-305.

25. Bednarski T, Olichwier A, Opasinska A, Pyrkowska A, Gan AM, Ntambi JM, Dobrzyn P. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency reduces lipid accumulation in the heart by activating lipolysis independently of peroxisome proliferator-activated receptor α . Biochim Biophys Acta. 2016a; 1861(12 Pt A):2029-2037.

26. Bednarski T, Pyrkowska A, Opasińska A, Dobrzyń P. Regulation of cardiac metabolism and function by lipogenic factors. Postepy Hig Med Dosw (Online). 2016b; 70(0):644-653.

27. Bednarski TK, Duda MK, Dobrzyn P. Alterations of lipid metabolism in the heart in spontaneously hypertensive rats precedes left ventricular hypertrophy and cardiac dysfunction. Cells. 2022; 11(19):3032.

28. Bersuker K, Peterson CWH, To M, Sahl SJ, Savikhin V, Grossman EA, Nomura DK, Olzmann JA. A proximity labeling strategy provides insights into the composition and dynamics of lipid droplet proteomes. Dev Cell. 2018; 44(1):97-112.

29. Bertrand L, Auquier J, Renguet E, Angé M, Cumps J, Horman S, Beauloye C. Glucose transporters in cardiovascular system in health and disease. Pflugers Arch. 2020; 472(9):1385-1399.

30. Binczek E, Jenke B, Holz B, Günter RH, Thevis M, Stoffel W. Obesity resistance of the stearoyl-CoA desaturase-deficient (scd1-/-) mouse results from disruption of the epidermal lipid barrier and adaptive thermoregulation. Biol Chem. 2007; 388(4):405-418.

31. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959; 37(8):911-917.

32. Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, Aziz S, Johnson JI, Bugger H, Zaha VG, Abel ED. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. Diabetes. 2007; 56(10):2457-2466

33. Brown AL, Mark Brown J. Critical roles for α/β hydrolase domain 5 (ABHD5)/comparative gene identification-58 (CGI-58) at the lipid droplet interface and beyond. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017; 1862(10 Pt B):1233-1241.

34. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. Endocrinology. 2005; 146(12):5341-5349.

35. Burchat N, Akal T, Ntambi JM, Trivedi N, Suresh R, Sampath H. SCD1 is nutritionally and spatially regulated in the intestine and influences systemic postprandial lipid homeostasis and gut-liver crosstalk. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2022; 1867(9):159195.

36. Burchfield JG, Kebede MA, Meoli CC, Stöckli J, Whitworth PT, Wright AL, Hoffman NJ, Minard AY, Ma X, Krycer JR, Nelson ME, Tan SX, Yau B, Thomas KC, Wee NKY, Khor EC, Enriquez RF, Vissel B, Biden TJ, Baldock PA, Hoehn KL, Cantley J, Cooney GJ, James DE, Fazakerley DJ. High dietary fat and sucrose results in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice. J Biol Chem. 2018; 293(15):5731-5745.

37. Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, Ezquer M, Gutiérrez J, Brandan E, Leiva A, Sobrevia L, Conget P. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. PLoS One. 2013; 8(4):e60931.

38. Cannon MV, Silljé HH, Sijbesma JW, Vreeswijk-Baudoin I, Ciapaite J, van der Sluis B, van Deursen J, Silva GJ, de Windt LJ, Gustafsson JÅ, van der Harst P, van Gilst WH, de Boer RA. Cardiac LXR α protects against pathological cardiac hypertrophy and dysfunction by enhancing glucose uptake and utilization. EMBO Mol Med. 2015; 7(9):1229-1243.

39. Cao B, Liu C, Zhang Q, Dong Y. Maternal high-fat diet leads to non-alcoholic fatty liver disease through upregulating hepatic SCD1 expression in neonate rats. Front Nutr. 2020; 7:581723.

40. Carley AN, Atkinson LL, Bonen A, Harper ME, Kunnathu S, Lopaschuk GD, Severson DL. Mechanisms responsible for enhanced fatty acid utilization by perfused hearts from type 2 diabetic db/db mice. Arch Physiol Biochem. 2007; 113(2):65-75.

41. Carley AN, Lewandowski ED. Triacylglycerol turnover in the failing heart. Biochim Biophys Acta. 2016; 1861(10):1492-1499.

42. Carr RM, Peralta G, Yin X, Ahima RS. Absence of perilipin 2 prevents hepatic steatosis, glucose intolerance and ceramide accumulation in alcohol-fed mice. PLoS One. 2014; 9(5):e97118.

43. Cerk IK, Wechselberger L, Oberer M. Adipose triglyceride lipase regulation: an overview. Curr Protein Pept Sci. 2018; 19(2):221-233.

44. Chen HC, Ladha Z, Farese RV Jr. Deficiency of acyl coenzyme a:diacylglycerol acyltransferase 1 increases leptin sensitivity in murine obesity models. Endocrinology. 2002a; 143(8):2893-8.

45. Chen HC, Smith SJ, Ladha Z, Jensen DR, Ferreira LD, Pulawa LK, McGuire JG, Pitas RE, Eckel RH, Farese RV Jr. Increased insulin and leptin sensitivity in mice lacking acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase 1. J Clin Invest. 2002b; 109(8):1049-55.

46. Chen J, Levin LR, Buck J. Role of soluble adenylyl cyclase in the heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012; 302(3):538-543.

47. Chen L, Qin Y, Liu B, Gao M, Li A, Li X, Gong G. PGC-1α-Mediated Mitochondrial Quality Control: Molecular Mechanisms and Implications for Heart Failure. Front Cell Dev Biol. 2022; 10:871357.

48. Chen L, Zhang Q, Meng Y, Zhao T, Mu C, Fu C, Deng C, Feng J, Du S, Liu W, Geng G, Ma K, Cheng H, Liu Q, Luo Q, Zhang J, Du Z, Cao L, Wang H, Liu Y, Lin J, Chen G, Liu L, Lam SM, Shui G, Zhu Y, Chen Q. Saturated fatty acids increase LPI to reduce FUNDC1 dimerization and stability and mitochondrial function. EMBO Rep. 2023; 24(4):e54731.

49. Chen S, Zou Y, Song C, Cao K, Cai K, Wu Y, Zhang Z, Geng D, Sun W, Ouyang N, Zhang N, Li Z, Sun G, Zhang Y, Sun Y, Zhang Y. The role of glycolytic metabolic pathways in cardiovascular disease and potential therapeutic approaches. Basic Res Cardiol. 2023b; 118(1):48.

50. Cheng V, Kimball DR, Conboy DJC. Determination of the rate-limiting step in fatty acid transport. J Phys Chem B. 2019; 123(33):7157-7168.

51. Chiu HC, Kovacs A, Blanton RM, Han X, Courtois M, Weinheimer CJ, Yamada KA, Brunet S, Xu H, Nerbonne JM, Welch MJ, Fettig NM, Sharp TL, Sambandam N, Olson KM, Ory DS, Schaffer JE. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. Circ Res. 2005; 96(2):225-233.

52. Christianson JL, Nicoloro S, Straubhaar J, Czech MP. Stearoyl-CoA desaturase 2 is required for peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and adipogenesis in cultured 3T3-L1 cells. J Biol Chem. 2008; 283(5):2906-29016.

53. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, Nielsen LB. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. Endocrinology. 2003;144(8):3483-9340.

54. Clifford BL, Sedgeman LR, Williams KJ, Morand P, Cheng A, Jarrett KE, Chan AP, Brearley-Sholto MC, Wahlström A, Ashby JW, Barshop W, Wohlschlegel J, Calkin AC, Liu Y, Thorell A, Meikle PJ, Drew BG, Mack JJ, Marschall HU, Tarling EJ, Edwards PA, de Aguiar

Vallim TQ. FXR activation protects against NAFLD via bile-acid-dependent reductions in lipid absorption. Cell Metab. 2021; 33(8):1671-1684.

55. Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. Prog Lipid Res. 2004;43(2):134-176.

56. Collins HE, Pat BM, Zou L, Litovsky SH, Wende AR, Young ME, Chatham JC. Novel role of the ER/SR Ca2+ sensor STIM1 in the regulation of cardiac metabolism. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019; 316(5):1014-1026.

57. Czarzasta K, Koperski Ł, Fus Ł, Wojno O, Górnicka B, Cudnoch-Jędrzejewska A. The effects of a high-fat diet on left ventricular fibrosis. Kardiol Pol. 2018; 76(4):802-804.

58. Dawson TJ, Webster KN, Mifsud B, Raad E, Lee E, Needham AD. Functional capacities of marsupial hearts: size and mitochondrial parameters indicate higher aerobic capabilities than generally seen in placental mammals. J Comp Physiol B. 2003; 173(7):583-590.

59. de Moura RF, Nascimento LF, Ignacio-Souza LM, Morari J, Razolli DS, Solon C, de Souza GF, Festuccia WT, Velloso LA. Hypothalamic stearoyl-CoA desaturase-2 (SCD2) controls whole-body energy expenditure. Int J Obes (Lond). 2016; 40(3):471-478.

60. de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH. Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. Hypertension. 1994; 23(5):600-606.

61. de Wilde J, Smit E, Mohren R, Boekschoten MV, de Groot P, van den Berg SA, Bijland S, Voshol PJ, van Dijk KW, de Wit NW, Bunschoten A, Schaart G, Hulshof MF, Mariman EC. An 8-week high-fat diet induces obesity and insulin resistance with small changes in the muscle transcriptome of C57BL/6J mice. J Nutrigenet Nutrigenomics. 2009; 2(6):280-291.

62. DeLany JP, Windhauser MM, Champagne CM, Bray GA. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. Am J Clin Nutr. 2000; 72(4):905-911.

63. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. Circulation. 1977; 55(4):613-618.

64. Dhalla NS, Yates JC, Proveda V. Calcium-linked changes in myocardial metabolism in the isolated perfused rat heart. Can J Physiol Pharmacol. 1977; 55(4):925-933.

65. Ding L, Sun W, Balaz M, He A, Klug M, Wieland S, Caiazzo R, Raverdy V, Pattou F, Lefebvre P, Lodhi IJ, Staels B, Heim M, Wolfrum C. Peroxisomal β-oxidation acts as a sensor for intracellular fatty acids and regulates lipolysis. Nat Metab. 2021; 3(12):1648-1661.

66. Dludla PV, Silvestri S, Orlando P, Mazibuko-Mbeje SE, Johnson R, Marcheggiani F, Cirilli I, Muller CJF, Louw J, Chellan N, Obonye N, Nkambule BB, Tiano L. Palmitate-induced toxicity is associated with impaired mitochondrial respiration and accelerated oxidative stress in cultured cardiomyocytes: The critical role of coenzyme Q9/10. Toxicol In Vitro. 2020; 68:104948.

67. Dobrzyn A, Gorski J. Ceramides and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: content and composition. Effect of prolonged exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002; 282(2):277-285.

68. Dobrzyn P, Dobrzyn A, Miyazaki M, Ntambi JM. Loss of stearoyl-CoA desaturase 1 rescues cardiac function in obese leptin-deficient mice. J Lipid Res. 2010; 51(8):2202-2210.

69. Dobrzyn P, Pyrkowska A, Duda MK, Bednarski T, Maczewski M, Langfort J, Dobrzyn A. Expression of lipogenic genes is upregulated in the heart with exercise training-induced but not

pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013; 304(12):1348-1358.

70. Dobrzyn P, Pyrkowska A, Jazurek M, Dobrzyn A. Increased availability of endogenous and dietary oleic acid contributes to the upregulation of cardiac fatty acid oxidation. Mitochondrion. 2012; 12(1):132-137.

71. Dobrzyn P, Sampath H, Dobrzyn A, Miyazaki M, Ntambi JM. Loss of stearoyl-CoA desaturase 1 inhibits fatty acid oxidation and increases glucose utilization in the heart. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008; 294(2):357-364.

72. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production. Circ Res. 2013; 113(6):709-724.

73. Drevinge C, Dalen KT, Mannila MN, Täng MS, Ståhlman M, Klevstig M, Lundqvist A, Mardani I, Haugen F, Fogelstrand P, Adiels M, Asin-Cayuela J, Ekestam C, Gådin JR, Lee YK, Nebb H, Svedlund S, Johansson BR, Hultén LM, Romeo S, Redfors B, Omerovic E, Levin M, Gan LM, Eriksson P, Andersson L, Ehrenborg E, Kimmel AR, Borén J, Levin MC. Perilipin 5 is protective in the ischemic heart. Int J Cardiol. 2016; 219:446-454.

74. Drosatos K, Schulze PC. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. Curr Heart Fail Rep. 2013; 10(2):109-121.

75. Druzhyna NM, Wilson GL, LeDoux SP. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. Mech Ageing Dev. 2008; 129(7-8):383-90.

76. D'Souza K, Nzirorera C, Kienesberger PC. Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity. Biochim Biophys Acta. 2016; 1861(10):1513-1524.

77. Dyck DJ, Steinberg G, Bonen A. Insulin increases FA uptake and esterification but reduces lipid utilization in isolated contracting muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001; 281(3):E600-7.

78. Dyck JR, Cheng JF, Stanley WC, Barr R, Chandler MP, Brown S, Wallace D, Arrhenius T, Harmon C, Yang G, Nadzan AM, Lopaschuk GD. Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. Circ Res. 2004; 94(9):78-84.

79. Dyck JR, Kudo N, Barr AJ, Davies SP, Hardie DG, Lopaschuk GD. Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. Eur J Biochem. 1999; 262(1):184-190.

80. Ebong IA, Goff DC Jr, Rodriguez CJ, Chen H, Bertoni AG. Mechanisms of heart failure in obesity. Obes Res Clin Pract. 2014; 8(6):540-548.

81. Egert S, Nguyen N, Schwaiger M. Contribution of alpha-adrenergic and beta-adrenergic stimulation to ischemia-induced glucose transporter (GLUT) 4 and GLUT1 translocation in the isolated perfused rat heart. Circ Res. 1999; 84(12):1407-1415.

82. Eid RA, Alkhateeb MA, El-Kott AF, Eleawa SM, Zaki MSA, Alaboodi SA, Salem Al-Shudiefat AA, Aldera H, Alnamar NM, Alassiri M, Khalil MA. A high-fat diet rich in corn oil induces cardiac fibrosis in rats by activating JAK2/STAT3 and subsequent activation of ANG II/TGF-1 β /Smad3 pathway: The role of ROS and IL-6 trans-signaling. J Food Biochem. 2019; 43(8):e12952.

83. Eisner DA, Caldwell JL, Trafford AW, Hutchings DC. The control of diastolic calcium in the heart: basic mechanisms and functional implications. Circ Res. 2020; 126(3):395-412.

84. Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. Biochim Biophys Acta. 2013; 1833(1):150-61.

85. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. Mol Aspects Med. 2006; 27(5-6):495-502.

86. Exil VJ, Roberts RL, Sims H, McLaughlin JE, Malkin RA, Gardner CD, Ni G, Rottman JN, Strauss AW. Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. Circ Res. 2003; 93(5):448-455.

87. Eyre NS, Cleland LG, Mayrhofer G. FAT/CD36 expression alone is insufficient to enhance cellular uptake of oleate. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 370(3):404-9.

88. Fillmore N, Mori J, Lopaschuk GD. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. Br J Pharmacol. 2014; 171(8):2080-2090.

89. Finck BN, Han X, Courtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, Gross RW, Kelly DP. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(3):1226-1231.

90. Flowers JB, Rabaglia ME, Schueler KL, Flowers MT, Lan H, Keller MP, Ntambi JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 improves insulin sensitivity in lean mice but worsens diabetes in leptin-deficient obese mice. Diabetes. 2007; 56(5):1228-1239.

91. Flowers MT, Ade L, Strable MS, Ntambi JM. Combined deletion of SCD1 from adipose tissue and liver does not protect mice from obesity. J Lipid Res. 2012; 53(8):1646-53.

92. Flowers MT, Groen AK, Oler AT, Keller MP, Choi Y, Schueler KL, Richards OC, Lan H, Miyazaki M, Kuipers F, Kendziorski CM, Ntambi JM, Attie AD. Cholestasis and hypercholesterolemia in SCD1-deficient mice fed a low-fat, high-carbohydrate diet. J Lipid Res. 2006; 47(12):2668-2680.

93. Flowers MT, Ntambi JM. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 2008; 19(3):248-256.

94. Flowers MT, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. Biochim Biophys Acta. 2009; 1791(2):85-91.

95. Ford DA, Han X, Horner CC, Gross RW. Accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool. Biochemistry. 1996; 35(24):7903-7909.

96. Francis GS, Chu C. Compensatory and maladaptive responses to cardiac dysfunction. Curr Opin Cardiol. 1994; 9(3):280-8.

97. Fraser F, Corstorphine CG, Zammit VA. Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane. Biochem J. 1997; 323 (Pt 3):711-718.

98. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. Science. 2011; 334(6054):358-362.

99. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. Identification of a functional peroxisome proliferatorresponsive element in the murine fatty acid transport protein gene. J Biol Chem. 1999; 274(7):3970-3977. 100. Funai K, Song H, Yin L, Lodhi IJ, Wei X, Yoshino J, Coleman T, Semenkovich CF. Muscle lipogenesis balances insulin sensitivity and strength through calcium signaling. J Clin Invest. 2013; 123(3):1229-40.

101. Ganguly R, Hasanally D, Stamenkovic A, Maddaford TG, Chaudhary R, Pierce GN, Ravandi A. Alpha linolenic acid decreases apoptosis and oxidized phospholipids in cardiomyocytes during ischemia/reperfusion. Mol Cell Biochem. 2018; 437(1-2):163-175.

102. Georgiadi A, Kersten S. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. Adv Nutr. 2012; 3(2):127-34.

103. Georgiou DK, Dagnino-Acosta A, Lee CS, Griffin DM, Wang H, Lagor WR, Pautler RG, Dirksen RT, Hamilton SL. Ca2+ binding/permeation via calcium channel, CaV1.1, regulates the intracellular distribution of the fatty acid transport protein, CD36, and fatty acid metabolism. J Biol Chem. 2015; 290(39):23751-23765.

104. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. Physiol Rev. 2010; 90(1):367-417.

105. Glatz JF, Nabben M, Heather LC, Bonen A, Luiken JJ. Regulation of the subcellular trafficking of CD36, a major determinant of cardiac fatty acid utilization. Biochim Biophys Acta. 2016; 1861(10):1461-1471.

106. Glatz JFC, Luiken JJFP. Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization. J Lipid Res. 2018; 59(7):1084-1093.

107. Glenn DJ, Wang F, Nishimoto M, Cruz MC, Uchida Y, Holleran WM, Zhang Y, Yeghiazarians Y, Gardner DG. A murine model of isolated cardiac steatosis leads to cardiomyopathy. Hypertension. 2011; 57(2):216-222.

108. Gopal K, Almutairi M, Al Batran R, Eaton F, Gandhi M, Ussher JR. Cardiac-specific deletion of pyruvate dehydrogenase impairs glucose oxidation rates and induces diastolic dysfunction. Front Cardiovasc Med. 2018; 5:17.

109. Guo Y, Wang Z, Qin X, Xu J, Hou Z, Yang H, Mao X, Xing W, Li X, Zhang X, Gao F. Enhancing fatty acid utilization ameliorates mitochondrial fragmentation and cardiac dysfunction via rebalancing optic atrophy 1 processing in the failing heart. Cardiovasc Res. 2018; 114(7):979-991.

110. Gutch M, Kumar S, Razi SM, Gupta KK, Gupta A. Assessment of insulin sensitivity/resistance. Indian J Endocrinol Metab. 2015; 19(1):160-164.

111. Hac-Wydro K, Wydro P. The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. Chem Phys Lipids. 2007; 150(1):66-81.

112. Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G, Zechner R. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. Science. 2006; 312(5774):734-737.

113. Haemmerle G, Moustafa T, Woelkart G, Büttner S, Schmidt A, van de Weijer T, Hesselink M, Jaeger D, Kienesberger PC, Zierler K, Schreiber R, Eichmann T, Kolb D, Kotzbeck P, Schweiger M, Kumari M, Eder S, Schoiswohl G, Wongsiriroj N, Pollak NM, Radner FP, Preiss-Landl K, Kolbe T, Rülicke T, Pieske B, Trauner M, Lass A, Zimmermann R, Hoefler G, Cinti S, Kershaw EE, Schrauwen P, Madeo F, Mayer B, Zechner R. ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. Nat Med. 2011; 17(9):1076-1085.

114. Hatanaka A, Nakada S, Matsumoto G, Satoh K, Aketa I, Watanabe A, Hirakawa T, Tsujita T, Waku T, Kobayashi A. The transcription factor NRF1 (NFE2L1) activates aggrephagy by inducing p62 and GABARAPL1 after proteasome inhibition to maintain proteostasis. Sci Rep. 2023; 13(1):14405.

115. He L, Kim T, Long Q, Liu J, Wang P, Zhou Y, Ding Y, Prasain J, Wood PA, Yang Q. Carnitine palmitoyltransferase-1b deficiency aggravates pressure overload-induced cardiac hypertrophy caused by lipotoxicity. Circulation. 2012; 126(14):1705-1716.

116. Heather LC, Carr CA, Stuckey DJ, Pope S, Morten KJ, Carter EE, Edwards LM, Clarke K. Critical role of complex III in the early metabolic changes following myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2010; 85(1):127-136.

117. Heier C, Radner FP, Moustafa T, Schreiber R, Grond S, Eichmann TO, Schweiger M, Schmidt A, Cerk IK, Oberer M, Theussl HC, Wojciechowski J, Penninger JM, Zimmermann R, Zechner R. G0/G1 switch gene 2 regulates cardiac lipolysis. J Biol Chem. 2015; 290(43):26141-26150.

118. Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R. Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. J Biol Chem. 2001; 276(39):36431-36437.

119. Holloway GP, Nickerson JG, Lally JSV, Petrick HL, Dennis KMJH, Jain SS, Alkhateeb H, Bonen A. Co-overexpression of CD36 and FABPpm increases fatty acid transport additively, not synergistically, within muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2022; 322(3):546-553.

120. Holman GD. Structure, function and regulation of mammalian glucose transporters of the SLC2 family. Pflugers Arch. 2020; 472(9):1155-1175.

121. Houten SM, Violante S, Ventura FV, Wanders RJ. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. Annu Rev Physiol. 2016; 78:23-44.

122. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc. 2009; 4(1):44-57.

123. Hue L, Taegtmeyer H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 297(3):578-591.

124. Hung YH, Carreiro AL, Buhman KK. Dgat1 and Dgat2 regulate enterocyte triacylglycerol distribution and alter proteins associated with cytoplasmic lipid droplets in response to dietary fat. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2017; 1862(6):600-614.

125. Hüttemann M, Klewer S, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Liu J, Lee M, Doan JW, Larson D, Slack E, Maghsoodi B, Erickson RP, Grossman LI. Mice deleted for heart-type cytochrome c oxidase subunit 7a1 develop dilated cardiomyopathy. Mitochondrion. 2012; 12(2):294-304.

126. Hwahng SH, Ki SH, Bae EJ, Kim HE, Kim SG. Role of adenosine monophosphateactivated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptoralpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones. Hepatology. 2009; 49(6):1913-1925.

127. Igal RA, Sinner DI. Stearoyl-CoA desaturase 5 (SCD5), a Δ -9 fatty acyl desaturase in search of a function. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2021; 1866(1):158840.

128. Iglesias J, Lamontagne J, Erb H, Gezzar S, Zhao S, Joly E, Truong VL, Skorey K, Crane S, Madiraju SR, Prentki M. Simplified assays of lipolysis enzymes for drug discovery and specificity assessment of known inhibitors. J Lipid Res. 2016; 57(1):131-141.

129. Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, Zhai P, Sciarretta S, Toli J, Nomura M, Mihara K, Egashira K, Ohishi M, Abdellatif M, Sadoshima J. Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress. Circ Res. 2015; 116(2):264-278.

130. Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, Hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H. Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. Circulation. 2005; 112(5):683-690.

131. Imai N, Nicholls HT, Alves-Bezerra M, Li Y, Ivanova AA, Ortlund EA, Cohen DE. Upregulation of thioesterase superfamily member 2 in skeletal muscle promotes hepatic steatosis and insulin resistance in mice. Hepatology. 2022; 75(1):154-169.

132. Irles E, Ñeco P, Lluesma M, Villar-Pazos S, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Alonso-Magdalena P, Carneiro EM, Boschero AC, Nadal Á, Quesada I. Enhanced glucose-induced intracellular signaling promotes insulin hypersecretion: pancreatic beta-cell functional adaptations in a model of genetic obesity and prediabetes. Mol Cell Endocrinol. 2015; 404:46-55.

133. Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. Lipids Health Dis. 2017; 16(1):83.

134. Janikiewicz J, Hanzelka K, Dziewulska A, Kozinski K, Dobrzyn P, Bernas T, Dobrzyn A. Inhibition of SCD1 impairs palmitate-derived autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in pancreatic β -cells. J Lipid Res. 2015; 56(10):1901-1911.

135. Jia G, Jia Y, Sowers JR. Contribution of maladaptive adipose tissue expansion to development of cardiovascular disease. Compr Physiol. 2016; 7(1):253-262.

136. Jiang M, Xu A, Tokmakejian S, Narayanan N. Thyroid hormone-induced overexpression of functional ryanodine receptors in the rabbit heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 278(5):1429-1438.

137. Jiang Z, Shen T, Huynh H, Fang X, Han Z, Ouyang K. Cardiolipin regulates mitochondrial ultrastructure and function in mammalian cells. Genes (Basel). 2022; 13(10):1889.

138. Jiménez-González S, Marín-Royo G, Jurado-López R, Bartolomé MV, Romero-Miranda A, Luaces M, Islas F, Nieto ML, Martínez-Martínez E, Cachofeiro V. The crosstalk between cardiac lipotoxicity and mitochondrial oxidative stress in the cardiac alterations in diet-induced obesity in rats. Cells. 2020; 9(2):451.

139. Joseph LC, Avula UMR, Wan EY, Reyes MV, Lakkadi KR, Subramanyam P, Nakanishi K, Homma S, Muchir A, Pajvani UB, Thorp EB, Reiken SR, Marks AR, Colecraft HM, Morrow JP. Dietary saturated fat promotes arrhythmia by activating NOX2 (NADPH Oxidase 2). Circ Arrhythm Electrophysiol. 2019; 12(11):e007573.

140. Joseph LC, Shi J, Nguyen QN, Pensiero V, Goulbourne C, Bauer RC, Zhang H, Morrow JP. Combined metabolomic and transcriptomic profiling approaches reveal the cardiac response to high-fat diet. iScience. 2022; 25(5):104184.

141. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF, Tontonoz P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. J Biol Chem. 2002; 277(13):11019-25.

142. Jump DB. Fatty acid regulation of gene transcription. Crit Rev Clin Lab Sci. 2004; 41(1):41-78.

143. Kaestner KH, Ntambi JM, Kelly TJ Jr, Lane MD. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. J Biol Chem. 1989; 264(25):14755-14761.

144. Kageyama Y, Hoshijima M, Seo K, Bedja D, Sysa-Shah P, Andrabi SA, Chen W, Höke A, Dawson VL, Dawson TM, Gabrielson K, Kass DA, Iijima M, Sesaki H. Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. EMBO J. 2014; 33(23):2798-2813.

145. Kaiyala KJ, Morton GJ, Leroux BG, Ogimoto K, Wisse B, Schwartz MW. Identification of body fat mass as a major determinant of metabolic rate in mice. Diabetes. 2010; 59(7):1657-1666.

146. Kang YJ. Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. Environ Health Perspect. 2001; 109 Suppl 1(Suppl 1):27-34.

147. Karamanlidis G, Lee CF, Garcia-Menendez L, Kolwicz SC Jr, Suthammarak W, Gong G, Sedensky MM, Morgan PG, Wang W, Tian R. Mitochondrial complex I deficiency increases protein acetylation and accelerates heart failure. Cell Metab. 2013; 18(2):239-250.

148. Kärkkäinen O, Tuomainen T, Mutikainen M, Lehtonen M, Ruas JL, Hanhineva K, Tavi P. Heart specific PGC-1 α deletion identifies metabolome of cardiac restricted metabolic heart failure. Cardiovasc Res. 2019; 115(1):107-118.

149. Karwi QG, Uddin GM, Ho KL, Lopaschuk GD. Loss of metabolic flexibility in the failing heart. Front Cardiovasc Med. 2018; 5:68.

150. Kato H, Sakaki K, Mihara K. Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. J Cell Sci. 2006; 119(Pt 11):2342-2353.

151. Kienesberger PC, Pulinilkunnil T, Nagendran J, Young ME, Bogner-Strauss JG, Hackl H, Khadour R, Heydari E, Haemmerle G, Zechner R, Kershaw EE, Dyck JR. Early structural and metabolic cardiac remodelling in response to inducible adipose triglyceride lipase ablation. Cardiovasc Res. 2013; 99(3):442-451.

152. Kienesberger PC, Pulinilkunnil T, Sung MM, Nagendran J, Haemmerle G, Kershaw EE, Young ME, Light PE, Oudit GY, Zechner R, Dyck JR. Myocardial ATGL overexpression decreases the reliance on fatty acid oxidation and protects against pressure overload-induced cardiac dysfunction. Mol Cell Biol. 2012; 32(4):740-750.

153. Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020; 17(3):169-183.

154. Kolwicz SC Jr, Liu L, Goldberg IJ, Tian R. Enhancing cardiac triacylglycerol metabolism improves recovery from ischemic stress. Diabetes. 2015; 64(8):2817-2827.

155. Kolwicz SC Jr, Olson DP, Marney LC, Garcia-Menendez L, Synovec RE, Tian R. Cardiacspecific deletion of acetyl CoA carboxylase 2 prevents metabolic remodeling during pressureoverload hypertrophy. Circ Res. 2012; 111(6):728-738.

156. Krenz M, Robbins J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. J Am Coll Cardiol. 2004; 44(12):2390-2397.

157. Kruszewska J, Cudnoch-Jedrzejewska A, Czarzasta K. Remodeling and fibrosis of the cardiac muscle in the course of obesity-pathogenesis and involvement of the extracellular matrix. Int J Mol Sci. 2022; 23(8):4195.

158. Kumar AA, Kelly DP, Chirinos JA. Mitochondrial dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. Circulation. 2019; 139(11):1435-1450.

159. Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, Nakamura TY, Wakabayashi S, Morinaga H, Nomura M, Yanase T, Otsu K, Usuda N, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Kojima Y, Hashimoto T, Sakai F, Hirose F, Osumi T. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation. J Biol Chem. 2012; 287(28):23852-23863.

160. Laczy B, Fülöp N, Onay-Besikci A, Des Rosiers C, Chatham JC. Acute regulation of cardiac metabolism by the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation. PLoS One. 2011; 6(4):e18417.

161. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680-685.

162. Lai L, Qiu H. The physiological and pathological roles of mitochondrial calcium uptake in heart. Int J Mol Sci. 2020; 21(20):7689.

163. Lee K, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. J Biol Chem. 2011; 286(29):25655-25662.

164. Lee Y, Naseem RH, Duplomb L, Park BH, Garry DJ, Richardson JA, Schaffer JE, Unger RH. Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(37):13624-13629.

165. Lewin TM, de Jong H, Schwerbrock NJ, Hammond LE, Watkins SM, Combs TP, Coleman RA. Mice deficient in mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 have diminished myocardial triacylglycerol accumulation during lipogenic diet and altered phospholipid fatty acid composition. Biochim Biophys Acta. 2008; 1781(6-7):352-358.

166.

167. Li J, Wu H, Liu Y, Yang L. High fat diet induced obesity model using four strainsof mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. Exp Anim. 2020; 69(3):326-335.

168. Li Q, Yu Q, Na R, Liu B. Omega-3 polyunsaturated fatty acids prevent murine dilated cardiomyopathy by reducing oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis. Exp Ther Med. 2017; 14(6):6152-6158.

169. Li Q, Zhu X, Ishikura S, Zhang D, Gao J, Sun Y, Contreras-Ferrat A, Foley KP, Lavandero S, Yao Z, Bilan PJ, Klip A, Niu W. Ca²⁺ signals promote GLUT4 exocytosis and reduce its endocytosis in muscle cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014; 307(2):209-224.

170. Li W, Fang Q, Zhong P, Chen L, Wang L, Zhang Y, Wang J, Li X, Wang Y, Wang J, Liang G. EGFR inhibition blocks palmitic acid-induced inflammation in cardiomyocytes and prevents hyperlipidemia-induced cardiac injury in mice. Sci Rep. 2016; 6:24580.

171. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100(6):3077-3082.

172. Liu L, Sanosaka M, Lei S, Bestwick ML, Frey JH Jr, Surovtseva YV, Shadel GS, Cooper MP. LRP130 protein remodels mitochondria and stimulates fatty acid oxidation. J Biol Chem. 2011; 286(48):41253-41264.

173. Liu L, Shi X, Bharadwaj KG, Ikeda S, Yamashita H, Yagyu H, Schaffer JE, Yu YH, Goldberg IJ. DGAT1 expression increases heart triglyceride content but ameliorates lipotoxicity. J Biol Chem. 2009; 284(52):36312-36323.

174. Liu L, Trent CM, Fang X, Son NH, Jiang H, Blaner WS, Hu Y, Yin YX, Farese RV Jr, Homma S, Turnbull AV, Eriksson JW, Hu SL, Ginsberg HN, Huang LS, Goldberg IJ. Cardiomyocyte-specific loss of diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) reproduces the abnormalities in lipids found in severe heart failure. J Biol Chem. 2014; 289(43):29881-29891.

175. Liu Q, Docherty JC, Rendell JC, Clanachan AS, Lopaschuk GD. High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation. J Am Coll Cardiol. 2002; 39(4):718-725.

176. Liu T, Wen H, Li H, Xu H, Xiao N, Liu R, Chen L, Sun Y, Song L, Bai C, Ge J, Zhang Y, Chen J. Oleic acid attenuates Ang II (Angiotensin II)-induced cardiac remodeling by inhibiting FGF23 (Fibroblast Growth Factor 23) expression in mice. Hypertension. 2020; 75(3):680-692.

177. Liu Y, Li J, Wu Y, Zhang H, Lv Q, Zhang Y, Zheng X, Tong N. Evidence from a systematic review and meta-analysis: Classical impaired glucose tolerance should be divided into subgroups of isolated impaired glucose tolerance and impaired glucose tolerance combined with impaired fasting glucose, according to the risk of progression to diabetes. Front Endocrinol (Lausanne). 2022; 13:835460.

178. Liu Z, Ding J, McMillen TS, Villet O, Tian R, Shao D. Enhancing fatty acid oxidation negatively regulates PPARs signaling in the heart. J Mol Cell Cardiol. 2020b; 146:1-11.

179. Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, Wende AR, Abel ED. Cardiac energy metabolism in heart failure. Circ Res. 2021; 128(10):1487-1513.

180. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. Physiol Rev. 2010; 90(1):207-258.

181. Louch WE, Hougen K, Mørk HK, Swift F, Aronsen JM, Sjaastad I, Reims HM, Roald B, Andersson KB, Christensen G, Sejersted OM. Sodium accumulation promotes diastolic dysfunction in end-stage heart failure following Serca2 knockout. J Physiol. 2010; 588(Pt 3):465-78.

182. Lu J, Liu J, Zhang L, Wang X, Zhang Y, Tang Q. Morphological and functional characterization of diabetic cardiomyopathy in db/db mice following exercise, metformin alone, or combination treatments. Biochem Biophys Res Commun. 2021; 584:80-86.

183. Lu M, Shyy JY. Sterol regulatory element-binding protein 1 is negatively modulated by PKA phosphorylation. Am J Physiol Cell Physiol. 2006; 290(6):1477-1486.

184. Luiken JJ, Arumugam Y, Dyck DJ, Bell RC, Pelsers MM, Turcotte LP, Tandon NN, Glatz JF, Bonen A. Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. J Biol Chem. 2001; 276(44):40567-40573.

185. Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, van der Vusse GJ, Glatz JF. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. Diabetes. 2003; 52(7):1627-1634.

186. Luiken JJFP, Nabben M, Neumann D, Glatz JFC. Understanding the distinct subcellular trafficking of CD36 and GLUT4 during the development of myocardial insulin resistance. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020; 1866(7):165775.

187. Luo H, Jiang M, Lian G, Liu Q, Shi M, Li TY, Song L, Ye J, He Y, Yao L, Zhang C, Lin ZZ, Zhang CS, Zhao TJ, Jia WP, Li P, Lin SY, Lin SC. AIDA selectively mediates downregulation of fat synthesis enzymes by ERAD to retard intestinal fat absorption and prevent obesity. Cell Metab. 2018; 27(4):843-853.

188. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. Circ Res. 1994; 75(3):401-409.

189. Ly LD, Xu S, Choi SK, Ha CM, Thoudam T, Cha SK, Wiederkehr A, Wollheim CB, Lee IK, Park KS. Oxidative stress and calcium dysregulation by palmitate in type 2 diabetes. Exp Mol Med. 2017; 49(2):e291.

190. Ma T, Lopez-Aguiar AG, Li A, Lu Y, Sekula D, Nattie EE, Freemantle S, Dmitrovsky E. Mice lacking G0S2 are lean and cold-tolerant. Cancer Biol Ther. 2014; 15(5):643-50.

191. MacDonald ML, Singaraja RR, Bissada N, Ruddle P, Watts R, Karasinska JM, Gibson WT, Fievet C, Vance JE, Staels B, Hayden MR. Absence of stearoyl-CoA desaturase-1 ameliorates features of the metabolic syndrome in LDLR-deficient mice. J Lipid Res. 2008; 49(1):217-229.

192. Man WC, Miyazaki M, Chu K, Ntambi J. Colocalization of SCD1 and DGAT2: implying preference for endogenous monounsaturated fatty acids in triglyceride synthesis. J Lipid Res. 2006; 47(9):1928-1939.

193. Mann DL, Felker GM. Mechanisms and models in heart failure: a translational approach. Circ Res. 2021; 128(10):1435-1450.

194. Marfella R, Di Filippo C, Portoghese M, Barbieri M, Ferraraccio F, Siniscalchi M, Cacciapuoti F, Rossi F, D'Amico M, Paolisso G. Myocardial lipid accumulation in patients with pressure-overloaded heart and metabolic syndrome. J Lipid Res. 2009; 50(11):2314-2323.

195. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. Nat Commun. 2020; 11(1):102.

196. Matsui H, Yokoyama T, Sekiguchi K, Iijima D, Sunaga H, Maniwa M, Ueno M, Iso T, Arai M, Kurabayashi M. Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) augments saturated fatty acidinduced lipid accumulation and inhibits apoptosis in cardiac myocytes. PLoS One. 2012; 7(3):e33283.

197. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985; 28(7):412-9.

198. Mattiazzi A, Kranias EG. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. Front Pharmacol. 2014; 5:5.

199. Maus M, Cuk M, Patel B, Lian J, Ouimet M, Kaufmann U, Yang J, Horvath R, Hornig-Do HT, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Moore KJ, Cuervo AM, Feske S. Store-operated Ca2+ entry controls induction of lipolysis and the transcriptional reprogramming to lipid metabolism. Cell Metab. 2017; 25(3):698-712.

200. Mauvoisin D, Mounier C. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. Biochimie. 2011; 93(1):78-86.

201. Mgbemena O, Zhang Y, Velarde G. Role of diabetes mellitus in heart failure with preserved ejection fraction: A Review Article. Cureus. 2021; 13(11):e19398.

202. Mîinea CP, Sano H, Kane S, Sano E, Fukuda M, Peränen J, Lane WS, Lienhard GE. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. Biochem J. 2005; 391(Pt 1):87-93.

203. Miyazaki M, Bruggink SM, Ntambi JM. Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Delta9-desaturase. J Lipid Res. 2006; 47(4):700-704.

204. Miyazaki M, Dobrzyn A, Elias PM, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-2 gene expression is required for lipid synthesis during early skin and liver development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(35):12501-12506.

205. Miyazaki M, Dobrzyn A, Sampath H, Lee SH, Man WC, Chu K, Peters JM, Gonzalez FJ, Ntambi JM. Reduced adiposity and liver steatosis by stearoyl-CoA desaturase deficiency are independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. J Biol Chem. 2004; 279(33):35017-35024.

206. Miyazaki M, Flowers MT, Sampath H, Chu K, Otzelberger C, Liu X, Ntambi JM. Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. Cell Metab. 2007; 6(6):484-496.

207. Miyazaki M, Gomez FE, Ntambi JM. Lack of stearoyl-CoA desaturase-1 function induces a palmitoyl-CoA Delta6 desaturase and represses the stearoyl-CoA desaturase-3 gene in the preputial glands of the mouse. J Lipid Res. 2002; 43(12):2146-2154.

208. Miyazaki M, Kim HJ, Man WC, Ntambi JM. Oleoyl-CoA is the major de novo product of stearoyl-CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol. J Biol Chem. 2001; 276(42):39455-39461.

209. Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. J Lipid Res. 2001; 42(7):1018-1024.

210. Miyazaki M, Sampath H, Liu X, Flowers MT, Chu K, Dobrzyn A, Ntambi JM. Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 380(4):818-822.

211. Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional regulation of adipogenesis. Compr Physiol. 2017; 7(2):635-674.

212. Murashige D, Jang C, Neinast M, Edwards JJ, Cowan A, Hyman MC, Rabinowitz JD, Frankel DS, Arany Z. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart. Science. 2020; 370(6514):364-368.

213. Murphy KA, Harsch BA, Healy CL, Joshi SS, Huang S, Walker RE, Wagner BM, Ernste KM, Huang W, Block RC, Wright CD, Tintle N, Jensen BC, Wells QS, Shearer GC, O'Connell TD. Free fatty acid receptor 4 responds to endogenous fatty acids to protect the heart from pressure overload. Cardiovasc Res. 2022; 118(4):1061-1073.

214. Nagendran J, Pulinilkunnil T, Kienesberger PC, Sung MM, Fung D, Febbraio M, Dyck JR. Cardiomyocyte-specific ablation of CD36 improves post-ischemic functional recovery. J Mol Cell Cardiol. 2013; 63:180-8.

215. Nagy HM, Paar M, Heier C, Moustafa T, Hofer P, Haemmerle G, Lass A, Zechner R, Oberer M, Zimmermann R. Adipose triglyceride lipase activity is inhibited by long-chain acylcoenzyme A. Biochim Biophys Acta. 2014; 1841(4):588-594.

216. Nakamura M, Sadoshima J. Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes. J Physiol. 2020; 598(14):2977-2993.

217. Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. Nat Rev Cardiol. 2018; 15(7):387-407.

218. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, Zinman B; American Diabetes Association. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. Diabetes Care. 2007; 30(3):753-9.

219. Neeland IJ, Gupta S, Ayers CR, Turer AT, Rame JE, Das SR, Berry JD, Khera A, McGuire DK, Vega GL, Grundy SM, de Lemos JA, Drazner MH. Relation of regional fat distribution to left ventricular structure and function. Circ Cardiovasc Imaging. 2013; 6(5):800-7.

220. Neely JR, Rovetto MJ, Oram JF. Myocardial utilization of carbohydrate and lipids. Prog Cardiovasc Dis. 1972; 15(3):289-329.

221. Nelson DW, Gao Y, Yen MI, Yen CL. Intestine-specific deletion of acyl-CoA:monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) 2 protects mice from diet-induced obesity and glucose intolerance. J Biol Chem. 2014; 289(25):17338-17349.

222. Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. N Engl J Med. 2007; 356(11):1140-51.

223. Neves FA, Cortez E, Bernardo AF, Mattos AB, Vieira AK, Malafaia Tde O, Thole AA, Rodrigues-Cunha AC, Garcia-Souza EP, Sichieri R, Moura AS. Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice. J Nutr Biochem. 2014; 25(1):50-57.

224. Nie L, Pascoa TC, Pike ACW, Bushell SR, Quigley A, Ruda GF, Chu A, Cole V, Speedman D, Moreira T, Shrestha L, Mukhopadhyay SMM, Burgess-Brown NA, Love JD, Brennan PE, Carpenter EP. The structural basis of fatty acid elongation by the ELOVL elongases. Nat Struct Mol Biol. 2021; 28(6):512-520.

225. Nielsen LB, Bartels ED, Bollano E. Overexpression of apolipoprotein B in the heart impedes cardiac triglyceride accumulation and development of cardiac dysfunction in diabetic mice. J Biol Chem. 2002; 277(30):27014-27020.

226. Nizar JM, Dong W, McClellan RB, Labarca M, Zhou Y, Wong J, Goens DG, Zhao M, Velarde N, Bernstein D, Pellizzon M, Satlin LM, Bhalla V. Na+-sensitive elevation in blood pressure is ENaC independent in diet-induced obesity and insulin resistance. Am J Physiol Renal Physiol. 2016; 310(9):812-820.

227. Ntambi JM, Buhrow SA, Kaestner KH, Christy RJ, Sibley E, Kelly TJ Jr, Lane MD. Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. J Biol Chem. 1988; 263(33):17291-17300.

228. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziorski CM, Yandell BS, Song Y, Cohen P, Friedman JM, Attie AD. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(17):11482-11486.

229. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. Prog Lipid Res. 2004; 43(2):91-104.

230. Ogasawara Y, Itakura E, Kono N, Mizushima N, Arai H, Nara A, Mizukami T, Yamamoto A. Stearoyl-CoA desaturase 1 activity is required for autophagosome formation. J Biol Chem. 2014; 289(34):23938-50.

231. Olichwier A, Balatskyi VV, Wolosiewicz M, Ntambi JM, Dobrzyn P. Interplay between thyroid hormones and stearoyl-CoA desaturase 1 in the regulation of lipid metabolism in the heart. Int J Mol Sci. 2020; 22(1):109.

232. Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019; 20(3):137-155.

233. O'Neill HM, Lally JS, Galic S, Thomas M, Azizi PD, Fullerton MD, Smith BK, Pulinilkunnil T, Chen Z, Samaan MC, Jorgensen SB, Dyck JR, Holloway GP, Hawke TJ, van Denderen BJ, Kemp BE, Steinberg GR. AMPK phosphorylation of ACC2 is required for

skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. Diabetologia. 2014; 57(8):1693-1702.

234. O'Neill LM, Phang YX, Matango M, Shamsuzzaman S, Guo CA, Nelson DW, Yen CE, Ntambi JM. Global deficiency of stearoyl-CoA desaturase-2 protects against diet-induced adiposity. Biochem Biophys Res Commun. 2020; 527(3):589-595.

235. Pagnon J, Matzaris M, Stark R, Meex RC, Macaulay SL, Brown W, O'Brien PE, Tiganis T, Watt MJ. Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. Endocrinology. 2012; 153(9):4278-4289.

236. Park HJ, Georgescu SP, Du C, Madias C, Aronovitz MJ, Welzig CM, Wang B, Begley U, Zhang Y, Blaustein RO, Patten RD, Karas RH, Van Tol HH, Osborne TF, Shimano H, Liao R, Link MS, Galper JB. Parasympathetic response in chick myocytes and mouse heart is controlled by SREBP. J Clin Invest. 2008; 118(1):259-71.

237. Park SY, Kim HJ, Wang S, Higashimori T, Dong J, Kim YJ, Cline G, Li H, Prentki M, Shulman GI, Mitchell GA, Kim JK. Hormone-sensitive lipase knockout mice have increased hepatic insulin sensitivity and are protected from short-term diet-induced insulin resistance in skeletal muscle and heart. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005; 289(1):30-39.

238. Paton CM, Ntambi JM. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 297(1):28-37.

239. Perdomo L, Beneit N, Otero YF, Escribano Ó, Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, Benito M. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. Cardiovasc Diabetol. 2015; 14:75.

240. Pereira RO, Wende AR, Olsen C, Soto J, Rawlings T, Zhu Y, Riehle C, Abel ED. GLUT1 deficiency in cardiomyocytes does not accelerate the transition from compensated hypertrophy to heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2014; 72:95-103.

241. Perna M, Hewlings S. Saturated fatty acid chain length and risk of cardiovascular sisease: a systematic review. Nutrients. 2022; 15(1):30.

242. Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, Zang M, Wu SY, Chiang CM, Veenstra TD, Kemper JK. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. J Biol Chem. 2010; 285(44):33959-33970.

243. Pulinilkunnil T, Kienesberger PC, Nagendran J, Waller TJ, Young ME, Kershaw EE, Korbutt G, Haemmerle G, Zechner R, Dyck JR. Myocardial adipose triglyceride lipase overexpression protects diabetic mice from the development of lipotoxic cardiomyopathy. Diabetes. 2013; 62(5):1464-1477.

244. Qian L, Zhu Y, Deng C, Liang Z, Chen J, Chen Y, Wang X, Liu Y, Tian Y, Yang Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases. Signal Transduct Target Ther. 2024; 9(1):50.

245. Qiao Q, Jousilahti P, Eriksson J, Tuomilehto J. Predictive properties of impaired glucose tolerance for cardiovascular risk are not explained by the development of overt diabetes during follow-up. Diabetes Care. 2003; 26(10):2910-2914.

246. Rabkin SW, Lodhia P. Stearic acid-induced cardiac lipotoxicity is independent of cellular lipid and is mitigated by the fatty acids oleic and capric acid but not by the PPAR agonist troglitazone. Exp Physiol. 2009; 94(8):877-887.

247. Rabkin SW. Epicardial fat: properties, function and relationship to obesity. Obes Rev. 2007; 8(3):253-261.

248. Rambold AS, Cohen S, Lippincott-Schwartz J. Fatty acid trafficking in starved cells: regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. Dev Cell. 2015; 32(6):678-692.

249. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet. 1963; 1(7285):785-789.

250. Razani B, Zhang H, Schulze PC, Schilling JD, Verbsky J, Lodhi IJ, Topkara VK, Feng C, Coleman T, Kovacs A, Kelly DP, Saffitz JE, Dorn GW 2nd, Nichols CG, Semenkovich CF. Fatty acid synthase modulates homeostatic responses to myocardial stress. J Biol Chem. 2011; 286(35):30949-30961.

251. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. Genes Dev. 2000; 14(22):2819-2830.

252. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S, Lonardo A, Carulli N, Loria P. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. J Gastroenterol Hepatol. 2009; 24(5):830-840.

253. Rijzewijk LJ, van der Meer RW, Smit JW, Diamant M, Bax JJ, Hammer S, Romijn JA, de Roos A, Lamb HJ. Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. J Am Coll Cardiol. 2008; 52(22):1793-1799.

254. Roberts DJ, Miyamoto S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy. Cell Death Differ. 2015; 22(2):248-257.

255. Roe ND, Handzlik MK, Li T, Tian R. The role of diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1 and 2 in cardiac metabolism and function. Sci Rep. 2018; 8(1):4983.

256. Rogowski MP, Flowers MT, Stamatikos AD, Ntambi JM, Paton CM. SCD1 activity in muscle increases triglyceride PUFA content, exercise capacity, and PPARδ expression in mice. J Lipid Res. 2013; 54(10):2636-2646.

257. Roussel J, Thireau J, Brenner C, Saint N, Scheuermann V, Lacampagne A, Le Guennec JY, Fauconnier J. Palmitoyl-carnitine increases RyR2 oxidation and sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak in cardiomyocytes: Role of adenine nucleotide translocase. Biochim Biophys Acta. 2015; 1852(5):749-758.

258. Saddik M, Lopaschuk GD. Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. J Biol Chem. 1991; 266(13):8162-8170.

259. Sampath H, Flowers MT, Liu X, Paton CM, Sullivan R, Chu K, Zhao M, Ntambi JM. Skin-specific deletion of stearoyl-CoA desaturase-1 alters skin lipid composition and protects mice from high fat diet-induced obesity. J Biol Chem. 2009; 284(30):19961-19973.

260. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annu Rev Nutr. 2005; 25:317-340.

261. Schaper J, Meiser E, Stämmler G. Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts. Circ Res. 1985; 56(3):377-391.

262. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. 2012; 9(7):671-675.

263. Schoonderwoerd K, Stam H. Lipid metabolism of myocardial endothelial cells. Mol Cell Biochem. 1992; 116(1-2):171-179.

264. Schulze PC, Drosatos K, Goldberg IJ. Lipid use and misuse by the heart. Circ Res. 2016; 118(11):1736-1751.

265. Schwartz DD, Williams JL, Malik KU. Contribution of calcium to isoproterenolstimulated lipolysis in the isolated perfused rabbit heart. Am J Physiol. 1993; 265(3 Pt 1):439-345.

266. Schweiger M, Paar M, Eder C, Brandis J, Moser E, Gorkiewicz G, Grond S, Radner FP, Cerk I, Cornaciu I, Oberer M, Kersten S, Zechner R, Zimmermann R, Lass A. G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. J Lipid Res. 2012; 53(11):2307-2317.

267. Schweitzer SC, Reding AM, Patton HM, Sullivan TP, Stubbs CE, Villalobos-Menuey E, Huber SA, Newell MK. Endogenous versus exogenous fatty acid availability affects lysosomal acidity and MHC class II expression. J Lipid Res. 2006; 47(11):2525-2537.

268. Scott JS, Nassar ZD, Swinnen JV, Butler LM. Monounsaturated fatty acids: key regulators of cell viability and intracellular signaling in cancer. Mol Cancer Res. 2022; 20(9):1354-1364.

269. Sessler AM, Kaur N, Palta JP, Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. J Biol Chem. 1996; 271(47):29854-29858.

270. Shan D, Li JL, Wu L, Li D, Hurov J, Tobin JF, Gimeno RE, Cao J. GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis. J Lipid Res. 2010; 51(7):1971-1981.

271. Shao D, Kolwicz SC Jr, Wang P, Roe ND, Villet O, Nishi K, Hsu YA, Flint GV, Caudal A, Wang W, Regnier M, Tian R. Increasing fatty acid oxidation prevents high-fat diet-induced cardiomyopathy through regulating Parkin-mediated mitophagy. Circulation. 2020; 142(10):983-997.

272. Shao D, Tian R. Glucose transporters in cardiac metabolism and hypertrophy. Compr Physiol. 2015; 6(1):331-351.

273. Shao W, Espenshade PJ. Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage regulates Golgi-to-endoplasmic reticulum recycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP). J Biol Chem. 2014; 289(11):7547-7557.

274. Shen J, Wu G, Tsai AL, Zhou M. Structure and mechanism of a unique diiron center in mammalian stearoyl-CoA desaturase. J Mol Biol. 2020; 432(18):5152-5161.

275. Sherman BT, Hao M, Qiu J, Jiao X, Baseler MW, Lane HC, Imamichi T, Chang W. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). Nucleic Acids Res. 2022; 50(W1):216-221.

276. Shi X, Qiu H. New insights into energy substrate utilization and metabolic remodeling in cardiac physiological adaption. Front Physiol. 2022; 13:831829.

277. Shi Y. Emerging roles of cardiolipin remodeling in mitochondrial dysfunction associated with diabetes, obesity, and cardiovascular diseases. J Biomed Res. 2010; 24(1):6-15.

278. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020; 21(7):363-383.

279. Sikder K, Shukla SK, Patel N, Singh H, Rafiq K. High fat diet upregulates fatty acid oxidation and ketogenesis via intervention of PPAR-γ. Cell Physiol Biochem. 2018; 48(3):1317-1331.

280. Siler SQ, Neese RA, Hellerstein MK. De novo lipogenesis, lipid kinetics, and whole-body lipid balances in humans after acute alcohol consumption. Am J Clin Nutr. 1999; 70(5):928-936.

281. Singh H. Mitochondrial ion channels in cardiac function. Am J Physiol Cell Physiol. 2021; 321(5):812-825.

282. Singh PK, Gari M, Choudhury S, Shukla A, Gangwar N, Garg SK. Oleic acid prevents isoprenaline-induced cardiac injury: effects on cellular oxidative stress, inflammation and histopathological alterations. Cardiovasc Toxicol. 2020; 20(1):28-48.

283. Sinha S, Perdomo G, Brown NF, O'Doherty RM. Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor kappa B. J Biol Chem. 2004; 279(40):41294-41301.

284. Smoak IW, Branch S. Glut-1 expression and its response to hypoglycemia in the embryonic mouse heart. Anat Embryol (Berl). 2000; 201(5):327-333.

285. Song M, Franco A, Fleischer JA, Zhang L, Dorn GW 2nd. Abrogating mitochondrial dynamics in mouse hearts accelerates mitochondrial senescence. Cell Metab. 2017; 26(6):872-883.

286. Song Y, Zhang Y, Wan Z, Pan J, Gao F, Li F, Zhou J, Chen J. CTRP3 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury via LAMP1/JIP2/JNK signaling pathway. Aging (Albany NY). 2022; 14(3):1321-1335.

287. Sorimachi H, Burkhoff D, Verbrugge FH, Omote K, Obokata M, Reddy YNV, Takahashi N, Sunagawa K, Borlaug BA. Obesity, venous capacitance, and venous compliance in heart failure with preserved ejection fraction. Eur J Heart Fail. 2021; 23(10):1648-1658.

288. Stolzmann P, Scheffel H, Leschka S, Schertler T, Frauenfelder T, Kaufmann PA, Marincek B, Alkadhi H. Reference values for quantitative left ventricular and left atrial measurements in cardiac computed tomography. Eur Radiol. 2008; 18(8):1625-1634.

289. Su X, Han X, Mancuso DJ, Abendschein DR, Gross RW. Accumulation of long-chain acylcarnitine and 3-hydroxy acylcarnitine molecular species in diabetic myocardium: identification of alterations in mitochondrial fatty acid processing in diabetic myocardium by shotgun lipidomics. Biochemistry. 2005; 44(13):5234-5245.

290. Subbaiah PV, Jiang XC, Belikova NA, Aizezi B, Huang ZH, Reardon CA. Regulation of plasma cholesterol esterification by sphingomyelin: effect of physiological variations of plasma sphingomyelin on lecithin-cholesterol acyltransferase activity. Biochim Biophys Acta. 2012; 1821(6):908-913.

291. Sun P, Wang T, Zhou Y, Liu H, Jiang H, Zhu W, Wang H. DC260126: a small-molecule antagonist of GPR40 that protects against pancreatic β -Cells dysfunction in db/db mice. PLoS One. 2013; 8(6):e66744.

292. Sun X, Haas ME, Miao J, Mehta A, Graham MJ, Crooke RM, Pais de Barros JP, Wang JG, Aikawa M, Masson D, Biddinger SB. Insulin dissociates the effects of liver X receptor on

lipogenesis, endoplasmic reticulum stress, and inflammation. J Biol Chem. 2016; 291(3):1115-1122.

293. Sung MM, Zordoky BN, Bujak AL, Lally JS, Fung D, Young ME, Horman S, Miller EJ, Light PE, Kemp BE, Steinberg GR, Dyck JR. AMPK deficiency in cardiac muscle results in dilated cardiomyopathy in the absence of changes in energy metabolism. Cardiovasc Res. 2015; 107(2):235-245.

294. Suriano F, Vieira-Silva S, Falony G, Roumain M, Paquot A, Pelicaen R, Régnier M, Delzenne NM, Raes J, Muccioli GG, Van Hul M, Cani PD. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin. Microbiome. 2021; 9(1):147.

295. Suzuki J, Ueno M, Uno M, Hirose Y, Zenimaru Y, Takahashi S, Osuga J, Ishibashi S, Takahashi M, Hirose M, Yamada M, Kraemer FB, Miyamori I. Effects of hormone-sensitive lipase disruption on cardiac energy metabolism in response to fasting and refeeding. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009; 297(5):111511-111524.

296. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. J Biol Chem. 1999; 274(15):10071-10078.

297. Takeshima H, Komazaki S, Hirose K, Nishi M, Noda T, Iino M. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. EMBO J. 1998; 17(12):3309-3316.

298. Tamura Y, Kawano S, Endo T. Lipid homeostasis in mitochondria. Biol Chem. 2020; 401(6-7):821-833.

299. Tan Y, Li M, Wu G, Lou J, Feng M, Xu J, Zhou J, Zhang P, Yang H, Dong L, Li J, Zhang X, Gao F. Short-term but not long-term high fat diet feeding protects against pressure overload-induced heart failure through activation of mitophagy. Life Sci. 2021; 272:119242.

300. Ternacle J, Wan F, Sawaki D, Surenaud M, Pini M, Mercedes R, Ernande L, Audureau E, Dubois-Rande JL, Adnot S, Hue S, Czibik G, Derumeaux G. Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. Eur Heart J Cardiovasc Imaging. 2017; 18(11):1283-1291.

301. Thoudam T, Ha CM, Leem J, Chanda D, Park JS, Kim HJ, Jeon JH, Choi YK, Liangpunsakul S, Huh YH, Kwon TH, Park KG, Harris RA, Park KS, Rhee HW, Lee IK. PDK4 augments ER-mitochondria contact to dampen skeletal muscle insulin signaling during obesity. Diabetes. 2019; 68(3):571-586.

302. Tokarska-Schlattner M, Kay L, Perret P, Isola R, Attia S, Lamarche F, Tellier C, Cottet-Rousselle C, Uneisi A, Hininger-Favier I, Foretz M, Dubouchaud H, Ghezzi C, Zuppinger C, Viollet B, Schlattner U. Role of cardiac AMP-activated protein kinase in a non-pathological setting: evidence from cardiomyocyte-specific, inducible AMP-activated protein kinase $\alpha 1\alpha 2$ knockout mice. Front Cell Dev Biol. 2021; 9:731015.

303. Tomas C, Elson JL, Newton JL, Walker M. Substrate utilisation of cultured skeletal muscle cells in patients with CFS. Sci Rep. 2020; 10(1):18232.

304. Tong M, Saito T, Zhai P, Oka SI, Mizushima W, Nakamura M, Ikeda S, Shirakabe A, Sadoshima J. Mitophagy is essential for maintaining cardiac function during high fat diet-induced diabetic cardiomyopathy. Circ Res. 2019; 124(9):1360-1371.

305. Torelli Hijo AH, Coutinho CP, Alba-Loureiro TC, Moreira Leite JS, Bargi-Souza P, Goulart-Silva F. High fat diet modulates the protein content of nutrient transporters in the small intestine of mice: possible involvement of PKA and PKC activity. Heliyon. 2019; 5(10):e02611.

306. Tortosa-Caparrós E, Navas-Carrillo D, Marín F, Orenes-Piñero E. Anti-inflammatory effects of omega 3 and omega 6 polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease and metabolic syndrome. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017; 57(16):3421-3429.

307. Tosi F, Sartori F, Guarini P, Olivieri O, Martinelli N. Delta-5 and delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. Adv Exp Med Biol. 2014; 824:61-81.

308. Tran DH, Wang ZV. Glucose metabolism in cardiac hypertrophy and heart failure. J Am Heart Assoc. 2019; 8(12):e012673.

309. Ueno M, Suzuki J, Zenimaru Y, Takahashi S, Koizumi T, Noriki S, Yamaguchi O, Otsu K, Shen WJ, Kraemer FB, Miyamori I. Cardiac overexpression of hormone-sensitive lipase inhibits myocardial steatosis and fibrosis in streptozotocin diabetic mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008; 294(6):1109-1118.

310. Wallace M, Metallo CM. Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. Semin Cell Dev Biol. 2020; 108:65-71.

311. Valm AM, Cohen S, Legant WR, Melunis J, Hershberg U, Wait E, Cohen AR, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome. Nature. 2017; 546(7656):162-167.

312. van Weeghel M, Abdurrachim D, Nederlof R, Argmann CA, Houtkooper RH, Hagen J, Nabben M, Denis S, Ciapaite J, Kolwicz SC Jr, Lopaschuk GD, Auwerx J, Nicolay K, Des Rosiers C, Wanders RJ, Zuurbier CJ, Prompers JJ, Houten SM. Increased cardiac fatty acid oxidation in a mouse model with decreased malonyl-CoA sensitivity of CPT1B. Cardiovasc Res. 2018; 114(10):1324-1334.

313. Vandevijvere S, Chow CC, Hall KD, Umali E, Swinburn BA. Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis. Bull World Health Organ. 2015; 93(7):446-456.

314. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. PLoS One. 2014; 9(5):e96801.

315. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. PLoS One. 2014; 9(5):e96801.

316. Varghese RT, Dalla Man C, Sharma A, Viegas I, Barosa C, Marques C, Shah M, Miles JM, Rizza RA, Jones JG, Cobelli C, Vella A. Mechanisms underlying the pathogenesis of isolated impaired glucose tolerance in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2016; 101(12):4816-4824.

317. Wai T, García-Prieto J, Baker MJ, Merkwirth C, Benit P, Rustin P, Rupérez FJ, Barbas C, Ibañez B, Langer T. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. Science. 2015; 350(6265):aad0116.

318. Wang H, Lei M, Hsia RC, Sztalryd C. Analysis of lipid droplets in cardiac muscle. Methods Cell Biol. 2013; 116:129-149.

319. Wang HT, Liu CF, Tsai TH, Chen YL, Chang HW, Tsai CY, Leu S, Zhen YY, Chai HT, Chung SY, Chua S, Yen CH, Yip HK. Effect of obesity reduction on preservation of heart function and attenuation of left ventricular remodeling, oxidative stress and inflammation in obese mice. J Transl Med. 2012; 10:145.

320. Wang J, Wilhelmsson H, Graff C, Li H, Oldfors A, Rustin P, Brüning JC, Kahn CR, Clayton DA, Barsh GS, Thorén P, Larsson NG. Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. Nat Genet. 1999; 21(1):133-137.

321. Wang X, Zhang X, Cao K, Zeng M, Fu X, Zheng A, Zhang F, Gao F, Zou X, Li H, Li M, Lv W, Xu J, Long J, Zang W, Chen J, Gao F, Ding J, Liu J, Feng Z. Cardiac disruption of SDHAF4-mediated mitochondrial complex II assembly promotes dilated cardiomyopathy. Nat Commun. 2022; 13(1):3947.

322. Wang Y, Qian Y, Fang Q, Zhong P, Li W, Wang L, Fu W, Zhang Y, Xu Z, Li X, Liang G. Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. Nat Commun. 2017; 8:13997.

323. Wang Y, Viscarra J, Kim SJ, Sul HS. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015; 16(11):678-689.

324. Waters KM, Miller CW, Ntambi JM. Localization of a negative thyroid hormone-response region in hepatic stearoyl-CoA desaturase gene 1. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 233(3):838-843.

325. Waters KM, Ntambi JM. Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. J Biol Chem. 1994; 269(44):27773-7.

326. Wedan RJ, Longenecker JZ, Nowinski SM. Mitochondrial fatty acid synthesis is an emergent central regulator of mammalian oxidative metabolism. Cell Metab. 2024; 36(1):36-47.

327. Wei X, Schultz K, Bazilevsky GA, Vogt A, Marmorstein R. Molecular basis for acetyl-CoA production by ATP-citrate lyase. Nat Struct Mol Biol. 2020; 27(1):33-41.

328. Wende AR, Kim J, Holland WL, Wayment BE, O'Neill BT, Tuinei J, Brahma MK, Pepin ME, McCrory MA, Luptak I, Halade GV, Litwin SE, Abel ED. Glucose transporter 4-deficient hearts develop maladaptive hypertrophy in response to physiological or pathological stresses. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017; 313(6):1098-1108.

329. WHO European Regional Obesity Report 2022. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

330. Wit M, Trujillo-Viera J, Strohmeyer A, Klingenspor M, Hankir M, Sumara G. When fat meets the gut-focus on intestinal lipid handling in metabolic health and disease. EMBO Mol Med. 2022; 14(5):e14742.

331. Wolosiewicz M, Balatskyi VV, Duda MK, Filip A, Ntambi JM, Navrulin VO, Dobrzyn P. SCD4 deficiency decreases cardiac steatosis and prevents cardiac remodeling in mice fed a high-fat diet. J Lipid Res. 2024; 65(9):100612.

332. Xie X, Tie YF, Lai S, Zhang YL, Li HH, Liu Y. Cardiac-specific CGI-58 deficiency activates the ER stress pathway to promote heart failure in mice. Cell Death Dis. 2021; 12(11):1003.

333. Xiong D, He H, James J, Tokunaga C, Powers C, Huang Y, Osinska H, Towbin JA, Purevjav E, Balschi JA, Javadov S, McGowan FX Jr, Strauss AW, Khuchua Z. Cardiac-specific

VLCAD deficiency induces dilated cardiomyopathy and cold intolerance. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2014; 306(3):326-338.

334. Xu Z, Qin Y, Lv B, Tian Z, Zhang B. Intermittent fasting improves high-fat diet-induced obesity cardiomyopathy via alleviating lipid deposition and apoptosis and decreasing m6A methylation in the heart. Nutrients. 2022; 14(2):251.

335. Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, Nakashima H, Ueno K, Tanaka T, Satouchi K, Hirose F, Osumi T. CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. J Lipid Res. 2007; 48(5):1078-1089.

336. Yamamoto T, Shimano H, Inoue N, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Takahashi A, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N. Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. J Biol Chem. 2007; 282(16):11687-11695.

337. Yan J, Young ME, Cui L, Lopaschuk GD, Liao R, Tian R. Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity. Circulation. 2009; 119(21):2818-2828.

338. Yang J, Guo Q, Feng X, Liu Y, Zhou Y. Mitochondrial dysfunction in cardiovascular diseases: Potential Targets for Treatment. Front Cell Dev Biol. 2022; 10:841523.

339. You H, Wen X, Wang X, Zhu C, Chen H, Bu L, Zhang J, Qu S. Derlin-1 ameliorates nonalcoholic hepatic steatosis by promoting ubiquitylation and degradation of FABP1. Free Radic Biol Med. 2023; 207:260-271.

340. Zadoorian A, Du X, Yang H. Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease. Nat Rev Endocrinol. 2023; 19(8):443-459.

341. Zangenberg NH, Müllertz A, Kristensen HG, Hovgaard L. A dynamic in vitro lipolysis model. I. Controlling the rate of lipolysis by continuous addition of calcium. Eur J Pharm Sci. 2001; 14(2):115-22.

342. Zechner R, Madeo F, Kratky D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017; 18(11):671-684.

343. Zemel MB. Role of dietary calcium and dairy products in modulating adiposity. Lipids. 2003; 38(2):139-46.

344. Zhang D, Wang F, Li P, Gao Y. Mitochondrial Ca2+ homeostasis: emerging roles and clinical significance in cardiac remodeling. Int J Mol Sci. 2022; 23(6):3025.

345. Zhang F, Xia X, Chai R, Xu R, Xu Q, Liu M, Chen X, Liu B, Liu S, Liu N. Inhibition of USP14 suppresses the formation of foam cell by promoting CD36 degradation. J Cell Mol Med. 2020; 24(6):3292-3302.

346. Zhang J, Kelley KL, Marshall SM, Davis MA, Wilson MD, Sawyer JK, Farese RV Jr, Brown JM, Rudel LL. Tissue-specific knockouts of ACAT2 reveal that intestinal depletion is sufficient to prevent diet-induced cholesterol accumulation in the liver and blood. J Lipid Res. 2012; 53(6):1144-1152.

347. Zhang J, Song F, Zhao X, Jiang H, Wu X, Wang B, Zhou M, Tian M, Shi B, Wang H, Jia Y, Wang H, Pan X, Li Z. EGFR modulates monounsaturated fatty acid synthesis through phosphorylation of SCD1 in lung cancer. Mol Cancer. 2017; 16(1):127.

348. Zhang Z, Liu S, Qi Y, Aluo Z, Zhang L, Yu L, Li Q, Luo Z, Sun Z, Zhou L, Li Y. Calcium supplementation relieves high-fat diet-induced liver steatosis by reducing energy metabolism and promoting lipolysis. J Nutr Biochem. 2021; 94:108645.

349. Zhao G, Jeoung NH, Burgess SC, Rosaaen-Stowe KA, Inagaki T, Latif S, Shelton JM, McAnally J, Bassel-Duby R, Harris RA, Richardson JA, Kliewer SA. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008; 294(2):936-943.

350. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu ZB. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). Int J Mol Med. 2019; 44(1):3-15.

351. Zheng Y, Prouty SM, Harmon A, Sundberg JP, Stenn KS, Parimoo S. Scd3--a novel gene of the stearoyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. Genomics. 2001; 71(2):182-191.

352. Zheng ZG, Xu YY, Liu WP, Zhang Y, Zhang C, Liu HL, Zhang XY, Liu RZ, Zhang YP, Shi MY, Yang H, Li P. Discovery of a potent allosteric activator of DGKQ that ameliorates obesity-induced insulin resistance via the sn-1,2-DAG-PKCε signaling axis. Cell Metab. 2023; 35(1):101-117.

353. Zhou B, Tian R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. J Clin Invest. 2018; 128(9):3716-3726.

354. Zhou Z, Zhang K, Liu Z, Gao X, Huang K, Chen C, Wang D, Yang Q, Long Q. ATPAF1 deficiency impairs ATP synthase assembly and mitochondrial respiration. Mitochondrion. 2021; 60:129-141.

355. Zhu F, Li P, Sheng Y. Treatment of myocardial interstitial fibrosis in pathological myocardial hypertrophy. Front Pharmacol. 2022; 13:1004181.

Spis publikacji Doktoranta

1. <u>Wolosiewicz M</u>, Balatskyi VV, Duda MK, Filip A, Ntambi JM, Navrulin VO, Dobrzyn P. SCD4 deficiency decreases cardiac steatosis and prevents cardiac remodeling in mice fed a high-fat diet. Journal of Lipid Research. 2024; 65(9): 100612.

2. Balatskyi VV, <u>Wolosiewicz M</u>, Dobosz AM, Tracz-Gaszewska Z, Sowka A, Kendziorek M, Krogulec E, Navrulin VO, Dobrzyn P, Effects of cellular lipids on heart in pathology and physiology. [w:] Ntambi JM (ed.), Cellular Lipid in Health and Disease, Academic Press, 2023: 303-337.

3. Olichwier A, Balatskyi VV, <u>Wolosiewicz M</u>, Ntambi JM, Dobrzyn P. Interplay between thyroid hormones and stearoyl-CoA desaturase 1 in the regulation of lipid metabolism in the heart. International Journal of Molecular Sciences. 2020; 22(1): 109.

4. Romaniuk K, Styczynski M, Decewicz P, Buraczewska O, Uhrynowski W, Fondi M, <u>Wolosiewicz M</u>, Szuplewska M, Dziewit L. Diversity and horizontal transfer of Antarctic Pseudomonas spp. plasmids. Genes (Basel). 2019; 10(11): 850.

5. Tabaczar S, <u>Wołosiewicz M</u>, Filip A, Olichwier A, Dobrzyń P. The role of stearoyl-CoA desaturase in the regulation of cardiac metabolism. Postepy Biochemii. 2018; 64(3): 183-189.