

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE**



Mgr Mateusz Bosiacki

**METABOLIZM ENERGETYCZNY I BIOGENEZA
MITOCHONDRIÓW W MIĘŚNIACH SZCZURÓW
PODDANYCH IMERSJI W ZIMNEJ WODZIE**

**Energy metabolism and mitochondrial biogenesis in muscles of rats
subjected to cold water immersion**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki o zdrowiu

Promotor: *prof. dr hab. n. med. Anna Lubkowska*

Szczecin 2024 r.

Podziękowania

*Składam serdeczne podziękowania dla Promotora mojej pracy,
Pani prof. dr hab. n. med. Anny Lubkowskiej
za cierpliwość, wyrozumiałość i wielkie wsparcie
oraz za przekazaną wiedzę i cenne wskazówki merytoryczne
podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej*

Pracę dedykuję moim Rodzicom i Dziadkom

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW:

ADP - adenozyno-5'- difosforan (ang. *adenosine diphosphate*)

Ado - adenozyna (ang. *adenosine*)

AEC - ładunek energetyczny adenylanów (ang. *adenylate energy charge*)

AIF - czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*)

AMPK - kinaza AMP (ang. *AMP kinase*)

ATP - adenozyno-5'- trifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

CaMKII - zależna od wapnia/kalmoduliny kinaza białkowa II (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*)

Cdk1 - zależna od cyklin kinaza 1 (ang. *cyclin-dependent kinase 1*)

CREB - białko wiążące z elementami odpowiedzi na cAMP (ang. *cAMP response element binding protein*)

DNM 1 - DNA metylotransferaza 1 (ang. *DNA methyltransferase*)

Drp1 - białko związane z dynaminą 1 (ang. *dynammin-related protein 1*)

ER - reticulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*)

ERR- α - receptor związany z estrogenem (ang. *estrogen related receptor α*)

FGF21 - czynnik wzrostu fibroblastów 21 (ang. *fibroblast growth factor 21*)

Fis1 - (ang. *mitochondrial fission protein 1*)

GTP - guanozyno-5'- trifosforan (ang. *guanosine triphosphate*)

HPLC - wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high performance liquid chromatography*)

MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

Mff - (ang. *mitochondrial fission factor*)

Mfn1 - mitofuzyna 1 (ang. *mitofusin 1*)

Mfn2 - mitofuzyna 2 (ang. *mitofusin 2*)

Mt DNA - mitochondrialne DNA (ang. *mitochondrial DNA*)

NRF-1 - (ang. *nuclear respiratory factor 1*)

NRF-2 - (ang. *nuclear respiratory factor 2*)

Opa1 - (ang. *optic atrophy 1*)

PGC1- α - białko koaktywatora 1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator*)

PKA - kinaza białkowa zależna od cAMP (ang. *cAMP dependent protein kinase*)

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

qRT PCR - metoda łańcuchowej reakcji polimerazy z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

SIRT-1 - (ang. *silent information regulator-1*)

TAN - pula nukleotydów adenylowych (ang. *total adenine nucleotide*)

TFAM - czynnik transkrypcyjny α (ang. *mitochondrial transcription factor α*)

SPIS TREŚCI

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW	3
1. WPROWADZENIE	7
2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA	7
2.1. ROLA MITOCHONDRIÓW W KOMÓRCIE.....	7
2.2. DYNAMIKA MITOCHONDRIÓW – PROCES FUZJI.....	9
2.3. DYNAMIKA MITOCHONDRIÓW – PROCES FIZJI.....	10
2.4. ZWIĄZEK DYSTRYBUCJI I DYNAMIKI MITOCHONDRIÓW Z ZAPOTRZEBOWANIEM ENERGETYCZNYM KOMÓRKI.....	12
2.4.1. <i>Bioenergetyczna rola fuzji mitochondriów</i>	15
2.4.2. <i>Bioenergetyczna rola fizji mitochondriów</i>	17
2.4.3. <i>Adaptacja dynamiki mitochondrialnej do warunków bioenergetycznych</i>	18
2.5. METABOLICZNA REGULACJA DYNAMIKI MITOCHONDRIÓW.....	20
2.5.1. <i>Kontrola metaboliczna fragmentacji mitochondriów</i>	26
2.5.2. <i>Kontrola metaboliczna mitofagii</i>	29
2.6. BIOGENEZA MITOCHONDRIÓW.....	30
2.7. <i>Rola dynamiki mitochondrialnej w komórkach mięśni</i>	33
2.8. UNIWERSALNE ZNACZENIE METABOLIZMU PURYN.....	38
2.9. NUKLEOTYDY PURYNOWE A METABOLIZM ENERGETYCZNY KOMÓREK.....	38
3. HIPOTEZY BADAWCZE I CEL PRACY	39
4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	40
4.1. MODEL BADAŃ.....	40
4.2. PROCEDURA DOŚWIADCZALNA.....	41
4.3. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ.....	41
4.4. OZNACZENIE STĘŻENIA ATP, ADP, AMP, Ado METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC).....	43
4.5. OZNACZENIE EKSPRESJI GENÓW <i>PGC-1A</i> , <i>Mfn1</i> , <i>Mfn2</i> , <i>Opal</i> , <i>Drp1</i> METODĄ ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY Z OBRAZOWANIEM W CZASIE RZECZYWISTYM (qRT PCR).....	44
4.6. ANALIZA EKSPRESJI BIAŁKA <i>PGC-1α</i> METODĄ WESTERN BLOT.....	45
4.7. ANALIZA STATYSTYCZNA.....	49
5. WYNIKI	50
5.1. STĘŻENIE ATP W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	50
5.2. STĘŻENIE ADP W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	51
5.3. STĘŻENIE AMP W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	53
5.4. STĘŻENIE Ado W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	55
5.5. CAŁKOWITA PUŁA NUKLEOTYDÓW ADENYLANOWYCH (TAN) W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	56
5.6. WARTOŚĆ ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO ADENYLANÓW (AEC) W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	58
5.7. EKSPRESJA <i>PGC-1α</i> W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	60
5.8. EKSPRESJA <i>Mfn1</i> W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	63
5.9. EKSPRESJA <i>Mfn2</i> W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	65
5.10. EKSPRESJA <i>Opal</i> W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	66
5.11. EKSPRESJA <i>Drp1</i> W MIĘŚNIACH SZCZURÓW.....	68

6. DYSKUSJA	71
7. WNIOSKI	86
8. STRESZCZENIE	87
9. SUMMARY	89
10. PIŚMIENNICTWO	91
SPIS RYCIN.....	108
SPIS TABEL.....	109
ANEKS.....	110

1. WPROWADZENIE

Pomimo przekonania naukowców i lekarzy, że zmiana stylu życia wielu ludzi na „siedzący, przekarmiony i pobudzony” sprzyja rozwojowi chorób cywilizacyjnych, zrozumienie ważności tych czynników dla zachowania zdrowia jest nadal niewystarczające. Jednocześnie brakuje zrozumienia roli, jaką proste zmiany sposobu życia mogą odgrywać w profilaktyce wielu chorób, szczególnie w przebiegu starzenia. Ze względu na „postęp cywilizacyjny” i usprawnienia technologiczne, człowiek coraz rzadziej wychodzi poza strefę komfortu fizycznego i nie podlega już często obciążeniu czynnikami środowiskowymi jak np. niska temperatura czy intensywny wysiłek fizyczny. W związku z ograniczeniem konieczności uruchamiania mechanizmów adaptacyjnych ich sprawność i efektywność ulega osłabieniu, co w konsekwencji prowadzi do częstego przekraczania progu tolerancji organizmu na stresogenne czynniki egzo- i endogenne. W dłuższym czasie prowadzić to może przeciążenia organizmu, szczególnie w przypadku osób starszych o obniżonej fizjologicznej zdolności adaptacyjnej.

Jednym z kluczowych czynników „zdrowego starzenia się” jest aktywność fizyczna oraz zrównoważona dieta. Wysiłek fizyczny, w tym kąpiele w zimnej wodzie (również w naturalnych zbiornikach wodnych), uznawane są powszechnie za czynnik hartujący, oddziałujący pozytywnie na psychiczne i fizyczne zdrowie człowieka. W dotychczasowej literaturze naukowej znaleźć można jednak niewiele dowodów weryfikujących to przekonanie. Ponadto, najczęściej dotyczą one wpływu rozłącznego działania ekspozycji na zimno i wysiłek fizyczny, w kontekście wybranych parametrów fizjologicznych i biochemicznych krwi. Choć wysiłek fizyczny w zimnym środowisku związany jest ze zmianami w zakresie metabolizmu energetycznego w komórkach wielu tkanek, to wciąż niewiele jest również danych dotyczących jego wpływu na biogenezę mitochondriów i metabolizm energetyczny mięśni. Stąd wydaje się istotnym dokonanie takiej analizy w odniesieniu do kluczowych dla metabolizmu parametrów energetycznych.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. Rola mitochondriów w komórce

Mitochondria w komórce stanowią złożoną strukturę komórkową, która tworzy skomplikowaną sieć, pełniącą kluczową rolę w wielu procesach komórkowych jak: synteza

adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), buforowanie stężenia jonów wapnia w komórce, cykl Krebsa, β -oksydacja kwasów tłuszczowych. Organelle te są także miejscem syntezy steroidów i hemu, uczestniczą w regulacji procesów termogenezy, a także w procesach starzenia się i śmierci komórki na drodze apoptozy i nekrozy. Dlatego stanowią ważne miejsce, nie tylko dla produkcji energii, ale także dla transdukcji sygnałów i przeżycia komórki [Friedman i in. 2014]. W toku ewolucji mitochondria ukształtowane zostały z wchłoniętych α -proteobakterii (prekursorowych komórek eukariotycznych), stąd organelle te otacza podwójna błona lipidowa i posiadają one własny kolisty mitochondrialny DNA (mtDNA) kodujący 13 białek mitochondrialnych [Westermann 2010]. Zewnętrzna błona mitochondrialna zawiera białka, które oddziałują z białkami cytoplazmatycznymi oraz kompleksy i kanały białkowe uczestniczące w transporcie cząsteczek między mitochondriami i cytoplazmą. Wewnętrzna błona mitochondrialna ma dużą powierzchnię, jest silnie pofałdowana, zawiera również białkowe kompleksy łańcucha transportu elektronów. Wnętrze mitochondriów stanowi matrix, w której zawarte są m.in. rybosomy oraz mtDNA. Między zewnętrzną i wewnętrzną błoną mitochondrialną znajduje się przestrzeń międzybłonowa, w której zakotwiczone są białka regulujące działanie łańcucha oddechowego oraz transport cząsteczek do mitochondriów [Friedman i wsp. 2014].

Najważniejszą funkcją mitochondriów jest wytwarzanie energii w postaci ATP, która powstaje w wyniku fosforylacji oksydacyjnej w ciągu reakcji zachodzących dzięki łańcuchowi przenośników elektronów i kompleksów białkowych, w tym syntazy ATP, usytuowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Funkcjonowanie łańcucha oddechowego skutkuje wytworzeniem różnicy potencjału elektrochemicznego między macierzą mitochondrialną a przestrzenią międzybłonową, która zapewnia siłę napędową dla syntezy ATP, transportu Ca^{2+} do macierzy mitochondrialnej i który odzwierciedla stan energetyczny mitochondriów. Przepływ elektronów przez łańcuch przenośników może w prawidłowych warunkach prowadzić do uwolnienia niewielkiej ich ilości i oddziaływania z cząsteczkami tlenu, co prowadzi do wytworzenia reaktywnych form tlenu (ROS). W niewielkich ilościach w komórce ROS są istotne dla np. przekazywania sygnałów, ich nadmiar prowadzi jednak do stresu oksydacyjnego, który jest przyczyną uszkodzeń kwasów nukleinowych, białek i lipidów komórkowych [Linley i wsp. 2012, Ray i wsp. 2012].

Badania przyżyciowe, przeprowadzone na drożdżach i hodowlach komórkowych ujawniły, że mitochondria nie są strukturami stacjonarnymi, ale są dynamicznie regulowane, przechodząc powtarzające się fazy fuzji (łączenia) i fizji (fragmentacji), a nawet mają

zdolność do poruszania się w komórce [Liesa i wsp. 2009, Pernas i wsp. 2016]. Zjawisko powtarzających się cykli łączenia i fragmentacji mitochondriów jest określane mianem dynamiki mitochondrialnej, która dostosowuje morfologię mitochondriów do potrzeb metabolicznych całej komórki. Modyfikacje sieci mitochondrialnej zapewniają podlegające ścisłej kontroli i regulacji białka należące do rodziny GTPaz oraz białka regulujące cykl komórkowy i apoptozę [Mishra i wsp. 2016, Wilson i wsp. 2013]. Fuzja mitochondrialna jest szczególnie ważna dla aktywnych respiracyjnie komórek, ponieważ umożliwia rozprzestrzenianie metabolitów, enzymów i produktów genów mitochondrialnych w całym przedziale mitochondrialnym. Przyczynia się to do optymalizacji funkcji mitochondriów i przeciwdziała akumulacji mutacji w mtDNA w starzejących się komórkach. Pofragmentowane mitochondria są natomiast często obecne w komórkach nieaktywnych respiracyjnie. Fragmentacja mitochondriów odgrywa również ważną rolę w usuwaniu uszkodzonych mitochondriów. Stąd też łączenie i fragmentacja mitochondriów odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu funkcji mitochondriów i optymalizacji ich zdolności bioenergetycznych. Dynamikę łączenia i fragmentacji mitochondriów reguluje wiele szlaków sygnałowych w celu dostosowania kształtu tych organelli do stanu metabolicznego komórki. W zależności od typu i kondycji fizjologicznej mitochondria mogą być obecne w komórce jako liczne małe organelle lub mogą łączyć się i tworzyć sieć. Mitochondrialna dynamika służy wielu różnym funkcjom, takim jak: dystrybucja mitochondriów, procesy dziedziczenia, przebudowa mitochondriów podczas rozwoju oraz koordynacja procesu śmierci komórki poprzez uwolnienie czynników pro-apoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej [Friedman i wsp. 2014].

2.2 Dynamika mitochondriów – proces fuzji

Najistotniejszym celem fuzji mitochondriów jest wymiana mtDNA pomiędzy mitochondriami, co zapobiega nagromadzeniu zmutowanych genów mitochondrialnych. Jednocześnie wymiana białek i metabolitów zapewnia równomierny ich rozdział w całej sieci mitochondrialnej. Włączenie uszkodzonych mitochondriów do sieci daje również możliwość odzyskania ich prawidłowych funkcji. Zaburzenia procesu fuzji skutkują obniżeniem wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej i aktywności łańcucha oddechowego [Westermann 2012].

Wykazano, że fuzja mitochondriów obejmuje w pierwszej kolejności połączenie zewnętrznej błony mitochondrialnej, a następnie błony wewnętrznej. Procesy te regulowane są przez odrębne białka. Połączenie zewnętrznej błony mitochondrialnej w komórkach

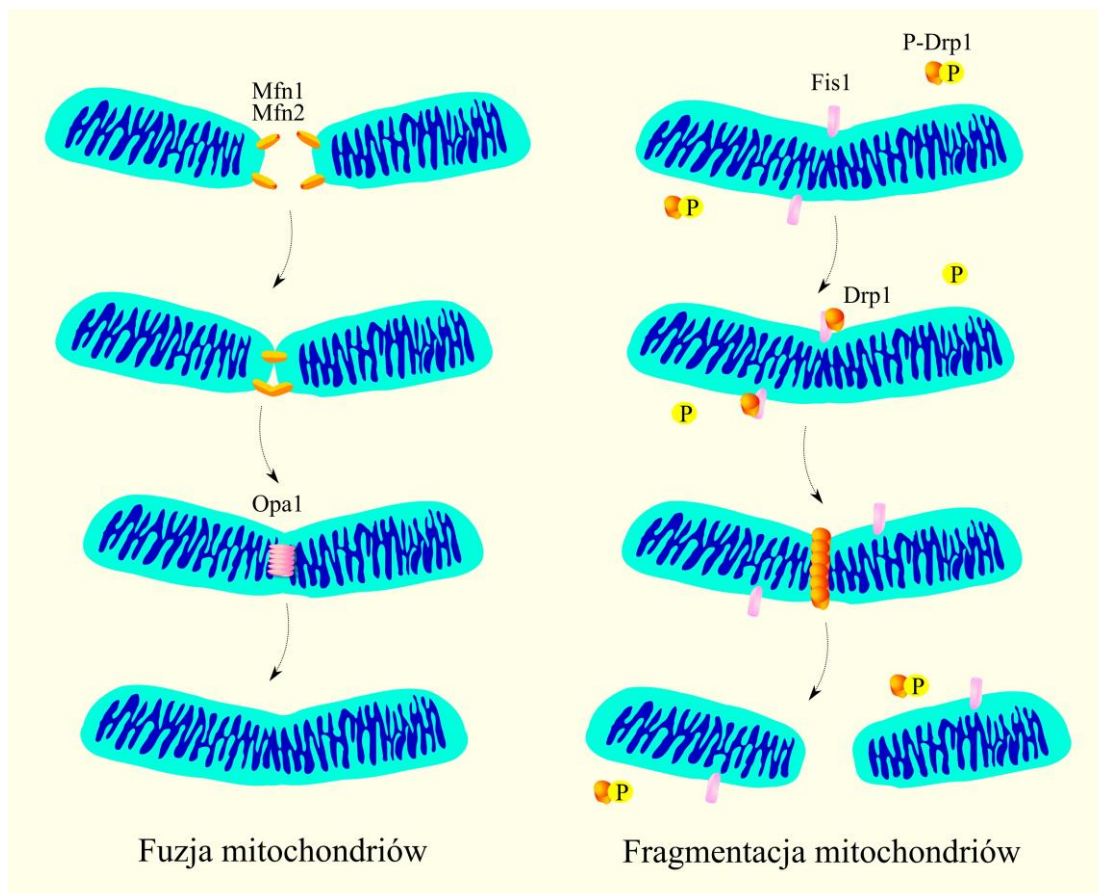
ssaków umożliwia aktywność mitofuzyny 1 (Mfn1) (ang. *mitofusin 1*) oraz mitofuzyny 2 (Mfn2) (ang. *mitofusin 2*) umiejscowionych w zewnętrznej błonie mitochondrialnej przez domenę transbłonową, znajdującą się na C-końcu białka. Zlokalizowany na C-końcu region superhelikalny składający się z 7 hydrofobowych reszt aminokwasowych pośredniczy w pierwszym etapie fuzji mitochondriów. Zadaniem tego regionu jest utworzenie podwójnych, skierowanych w przeciwnych kierunkach helis dimerów: Mfn1-Mfn1; Mfn2-Mfn2 lub Mfn1-Mfn2. N-koniec mitofuzyny zawiera domenę, która ma zdolność wiązania i hydrolizy guanozyno-5'-trifosforanu (GTP). Rozpad GTP umożliwia zmiany konformacji dwuwarstwy lipidowej zewnętrznej błony mitochondrialnej i jej połączenie [Mishra i wsp. 2016]. Aktywność mitofuzyn podlega ubikwitynylacji przez białko Parkin. Ta modyfikacja potranslacyjna skutkuje degradacją mitofuzyn w komórce, może się także wiązać z procesem mitofagii [Zorzano i wsp. 2015]. Za fuzję wewnętrznej błony mitochondrialnej odpowiedzialne jest białko Opa1 (ang. *optic atrophy 1*). Zakotwiczenie tego białka w wewnętrznej błonie mitochondrialnej zapewnia jego fragment znajdujący się w części N-końcowej. Obróbka potranslacyjna pozwala na powstanie długo- i krótkołańcuchowych form tego białka. Dotychczas wykazano istnienie 8 izoform białka Opa1 [Bertholet i wsp. 2016]. Długołańcuchowe formy są niezbędne do zajścia procesu fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej. Natomiast zwiększona ilość krótkołańcuchowej formy białka Opa1 nasila fragmentację sieci mitochondrialnej. Wykazano również, że równowaga między obiema formami białka jest niezbędna do utrzymania prawidłowego kształtu grzebieni mitochondrialnych [Westermann 2012]. Aktywność białka Opa1 jest regulowana przez proteazy YME1L i Oma1 znajdujące się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białko YME1L odpowiada za wydłużony kształt mitochondriów. Białko to jest degradowane przy obniżeniu wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej i spadku stężenia ATP w komórce. Takie warunki aktywują natomiast białko Oma1, które nie białko Opa1 i tym samym rozpoczyna fragmentację mitochondriów [Westermann 2012, Zhang 2014a, Zhang 2014b].

2.3. Dynamika mitochondriów – proces fizji

Fizja sieci mitochondrialnej umożliwia transport mitochondriów w komórce, pozwala na równomierny rozkład tych organelli do komórek potomnych podczas ich podziału oraz jest niezbędna do zajścia procesu mitofagii [Zorzano i wsp. 2015]. W komórkach ssaków za fragmentację sieci odpowiedzialne jest białko Drp1 (ang. *dynamin-related protein 1*). Liczne modyfikacje potranslacyjne tego białka (np. sumoilacja, ubikwitylacja, fosforylacja,

nitrozyllacja) są odpowiedzialne za oddziaływanie z mitochondriami, umożliwiając rekrutację do białek adaptorowych umiejscowionych w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Białkami adaptorowymi białka Drp1 są działające niezależnie od siebie białko Mff (ang. *mitochondrial fission factor*) oraz Fis1 (ang. *mitochondrial fission protein 1*). Wykazano, że zwiększenie ekspresji białka Mff silniej wpływa na przekształcenie sieci mitochondrialnej niż zmiana ekspresji białka Fis1 [Zorzano i wsp. 2015]. Rolę białek adaptorowych mogą również pełnić białka MiD49 i MiD51, jednakże nie poznano dotychczas mechanizmów ich działania [Zorzano i wsp. 2015]. Połączenie białka Drp1 z białkami adaptorowymi umożliwia utworzenie pierścienia wokół mitochondriów, który zaciskając się (skutkiem zmian konformacyjnych wywołanych dzięki aktywności GTPazowej Drp1) umożliwia fragmentację sieci mitochondrialnej [Westermann 2012].

Jedną z modyfikacji potranslacyjnych wpływających na oddziaływanie białek adaptorowych z białkiem Drp1 jest fosforylacja. Fosforylacja reszty seryny jest możliwa dzięki aktywności kinazy A, co hamuje rekrutację Drp1 do mitochondriów uniemożliwiając tym samym fragmentację sieci mitochondrialnej. Defosforylacja seryny katalizowana przez kalcyneurynę pozwala na przyłączenie białka do mitochondriów i umożliwia fragmentację sieci [Cereghetti i wsp. 2008]. Sumoilacja (związana z działaniem mitochondrialnej ligazy SUMO) stabilizuje białko Drp1 na powierzchni mitochondriów i nasila fragmentację sieci mitochondrialnej. Ubikwitylacja (związana z aktywnością ligazy ubikwitynowej) skutkuje translokacją Drp1 do mitochondriów i również nasila fragmentację sieci [Zorzano 2015]. Szczegółowo procesy regulacji aktywności białka Drp1 zostaną omówione w dalszej części pracy.



Rycina 1. Dynamika mitochondriów.

W fuzji zewnętrznej błony mitochondrialnej u ssaków pośredniczą białka z rodziny mitofuzyn (Mfn1- mitofuzyna 1 (ang. *mitofusion 1*) i Mfn 2 - mitofuzyna 2 (ang. *mitofusion 2*)). W fuzji wewnętrznej błony mitochondrialnej uczestniczy białko Opa1 (ang. *optic atrophy 1*). We fragmentacji mitochondriów pośredniczą białka z rodziny związanych z dynaminą (ang. *dynamain related proteins 1*) Drp1. Białkiem adaptorowym białka Drp1 jest m.in. białko Fis1 (ang. *mitochondrial fission protein 1*).

2.4. Związek dystrybucji i dynamiki mitochondriów z zapotrzebowaniem energetycznym komórki

Mitochondria często znajdują się w komórce w miejscach o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, np. w komórkach mięśniowych umiejscowione są w pobliżu białek motorycznych, które zużywają ATP podczas skurczu mięśni. Mitochondria położone są między miofibrilami na całej ich długości, aby zapewnić równomierne dostarczanie ATP do sarkomerów [Ogata i wsp. 1985]. Wykazano, że regularny układ mitochondriów jest szczególnie znaczący w komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych u owadów latających [Kleinow i wsp. 1971]. Również w neuronach [Li i wsp. 2004] i migrujących limfocytach [Campello i wsp. 2006] stwierdzono, że mitochondria gromadzą się w miejscach wysokiego zapotrzebowania na energię. Chociaż przykłady te pokazują

adaptację rozmieszczenia i morfologii mitochondriów do wymagań bioenergetycznych w wysoce zróżnicowanych komórkach, dynamiczne procesy przebudowy przedziału mitochondrialnego były najszerzej badane tylko w kulturach drożdży. Drożdże są cennym modelem do badania dynamiki mitochondriów, ponieważ są łatwe w hodowli, podatne na manipulacje genetyczne i zdolne do przełączania swojego metabolizmu energetycznego [Merz i wsp. 2007]. Preferowanymi substratami drożdży są ulegające fermentacji źródła węgla, takie jak glukoza lub fruktoza. Nawet gdy tlen jest dostępny, większość ATP jest wytwarzana w toku glikolizy z etanolem jako końcowym produktem fermentacji, a metabolizm tlenowy w komórkach drożdży jest w tych warunkach w znacznym stopniu zahamowany. Dopiero po wyczerpaniu ulegających fermentacji źródeł węgla indukcji ulegają geny niezbędne do oddychania mitochondrialnego, a ATP jest wytwarzane przez metabolizm niepodlegających fermentacji źródeł węgla i oddychanie mitochondrialne [Piskur i wsp. 2006]. Kształt, rozmiar i liczba mitochondriów są dostosowane do warunków wzrostu komórek drożdży. Zaobserwowano, że komórki drożdży zawierają tylko kilka mitochondriów gdy rosną w warunkach beztlenowych, podczas gdy ich masa i liczba są znacznie zwiększone podczas hodowli w warunkach sprzyjających metabolizmowi tlenowemu [Stevens 1981]. Komórki drożdży charakteryzujące się logarytmicznym wzrostem kolonii mają połączoną sieć mitochondrialną w pobliżu błony komórkowej, a sieć tych połączeń staje się znacznie bardziej złożona po przejściu ze źródeł węgla fermentowalnego na metabolity ulegające utlenieniu w warunkach tlenowych w mitochondriach [Stevens 1981, Visser 1995]. Z drugiej strony przeniesienie komórek z warunków, w których prowadzą oddychanie komórkowe w warunkach tlenowych do warunków fermentacyjnych prowadzi do zmniejszenia sieci mitochondriów w ciągu kilku godzin [Egner i wsp. 2002, Jakobs i wsp. 2003]. Położenie mitochondriów na obrzeżach komórki powoduje, że znajdują się one w pobliżu miejsca wlotu tlenu, a wydłużony kształt mitochondriów może sprzyjać rozpraszaniu energii w komórce [Jensen i wsp. 2000]. Sieć mitochondrialna ulega fragmentacji i tworzy wiele małych, okrągłych mitochondriów po wejściu w fazę stacjonarną [Gorsich i wsp. 2004, Dürr i wsp. 2006]. Wyniki tych badania sugerują, że opisana dynamiczna i wzajemnie połączona sieć mitochondrialna najlepiej spełnia potrzeby aktywnych oddechowo komórek drożdży.

Ponieważ badanie przemian mitochondriów w tkankach ssaków *in vivo* jest trudne, większość badań dotyczących dynamiki mitochondriów przeprowadzono na hodowlach komórkowych. W przeciwieństwie do tkanek, które wytwarzają większość ATP na drodze oddychania mitochondrialnego, stwierdzono, że wiele hodowanych linii komórkowych

wytwarza ATP głównie na drodze glikolizy. Dlatego obserwacje przeprowadzone na hodowlach komórkowych należy interpretować z ostrożnością, ponieważ każda pierwotna lub unieśmiertelniona linia komórkowa może wykazywać unikalne właściwości, a stan bioenergetyczny oraz morfologia i dynamika mitochondriów mogą silnie zależeć od warunków hodowli [Sauvanet i wsp. 2010]. Pamiętając o tych zastrzeżeniach, nie jest zaskakującym fakt, że znaleziono morfologicznie różne mitochondria w hodowlach komórek ssaków pochodzących nawet z tych samych linii komórkowych. Z jednej strony obserwowano morfologicznie odrębne małe ziarniste i nitkowate mitochondria, np. w komórkach HeLa, astrocytach i neuronach korowych czy hepatocytach [Collins i wsp. 2002], Jednocześnie znajdowano długie, wzajemnie połączone w sieci mitochondria w hodowlach ludzkich fibroblastów [Amchenkova 1988], dynamiczne i elektrycznie połączone mitochondria w komórkach COS-7 [De Giorgi i wsp. 2000] oraz rozgałęzione sieci mitochondrialne w komórkach HeLa [Rizzuto i wsp. 1998]. Wykazano, że hamowanie kompleksów łańcucha oddechowego przez niektóre leki wywołuje fragmentację sieci mitochondrialnej, co zaobserwowano w komórkach HeLa [Legros i wsp. 2002, Pletjushkina i wsp. 2006], komórkach CV1-4A [De Vos i wsp. 2005, Pletjushkina i wsp. 2006], mysich embrionalnych fibroblastach [De Vos i wsp. 2005], fibroblastach ludzkiej skóry [Liot i wsp. 2009], neuronach kory mózgu [Benart i wsp. 2007, Liot i wsp. 2009] i innych typach komórek [Sauvanet i wsp. 2010]. W przeciwieństwie do tego niektóre typy komórek zachowują nitkowate mitochondria nawet podczas hamowania łańcucha oddechowego, a fenotypy komórek z upośledzeniem oddychania spowodowanym wyłączeniem odpowiedniego genu mitochondrialnego są niejednorodne [Sauvanet i wsp. 2010]. Mitochondria wydają się być bardziej złożone i rozgałęzione w komórkach HeLa, gdy oddychanie mitochondrialne jest indukowane przez wzrost komórek w pożywce zawierającej galaktozę (w porównaniu z tymi rosnącymi na podłożu z glukozą), takiego wpływu nie obserwowano natomiast w fibroblastach MRC5 [Rossignol i wsp. 2004].

Podsumowując, większość dostępnych danych wskazuje na funkcjonalny związek między zmianami metabolizmu energetycznego i adaptacją morfologii mitochondriów w komórkach ssaków. Wydaje się, że wzajemnie połączone sieci mitochondrialne są często obecne w komórkach metabolicznie i oddechowo aktywnych, podczas gdy małe i pofragmentowane mitochondria są bardziej rozpowszechnione w komórkach w stanie spoczynku, nieaktywnych oddechowo.

2.4.1 Bioenergetyczna rola fuzji mitochondriów

Fuzja mitochondrialna umożliwia efektywne mieszanie zawartości mitochondriów i tworzenie rozbudowanych sieci mitochondrialnych. Takie działanie jest korzystne w warunkach dużego zapotrzebowania na energię, a przerwanie fuzji mitochondrialnej skutkuje dysfunkcją mitochondriów i utratą wydolności oddechowej zarówno w komórkach drożdży, jak i w komórkach ssaków [Chen i wsp. 2003, Chen i wsp. 2005]. Zaobserwowano, że usunięcie genów *FZO1* lub *MGMI* kodujących kluczowe komponenty mechanizmu fuzji mitochondrialnej, prowadzi do szybkiej utraty genomu mitochondrialnego u drożdży [Jones i wsp., Merz i wsp. 2009]. Ponieważ mitochondrialne mtDNA koduje kilka podjednostek łańcucha oddechowego, trudno jest określić, czy utrata zdolności do fuzji bezpośrednio przyczynia się do spadku wydolności oddechowej, czy też mutanty drożdży pozbawione zdolności fuzji są pośrednią konsekwencją defektu w dziedziczeniu mtDNA. Delecja genu *DNMI*, kodującego kluczowy mediator rozszczepienia mitochondriów, wpływa pozytywnie na żywotność drożdży [Scheckhuber i wsp. 2007]. Nie wiadomo dokładnie, czy długowieczność jest bezpośrednio związana z silnie rozbudowaną siecią mitochondrialną charakterystyczną dla mutantów drożdży z defektem fragmentacji, czy też jest związana z inaktywacją szlaków śmierci komórki na drodze apoptozy lub z innymi przyczynami. Ponadto delecja genu *MGMI* skraca żywotność komórek drożdży [Scheckhuber i wsp. 2011], co sugeruje, że fuzja mitochondrialna jest niezbędna dla prawidłowej fizjologii komórki. Jednak nie wiadomo, czy utrata mtDNA u mutantów *MGMI* [Jones i wsp. 1992] ma wpływ na długość życia komórek drożdży i czy istnieje bezpośredni związek między aktywnością fuzji mitochondrialnej a wydolnością oddechową drożdży. Wykazano także, że mysie embrionalne fibroblasty pozbawione białek fuzyjnych Mfn1 lub Mfn2 są w stanie utrzymać mtDNA, ale wykazują obniżony potencjał błony mitochondrialnej [Chen i wsp. 2003]. Zmutowane komórki, które zawierają mocno pofragmentowane mitochondria ale zachowują resztkową aktywność fuzji mitochondrialnej, nie ulegają poważnym dysfunkcjom. Natomiast komórki nie wykazujące aktywności fuzyjnej mają obniżoną fosforylację oksydacyjną [Chen i wsp. 2005]. Zatem fuzja i wymieszanie zawartości mitochondriów wydaje się być głównym czynnikiem zdolności do utrzymania fosforylacji oksydacyjnej komórek ssaków. Można przypuszczać, że fragmentacja sieci mitochondrialnej nieuchronnie generuje podfrakcje mitochondriów pozbawionych mtDNA lub innych istotnych elementów łańcucha oddechowego [Chen i wsp. 2005]. W przypadku braku jakiegokolwiek aktywnej fuzji, te fragmenty mitochondrialne będą pozbawione podjednostek łańcucha oddechowego zakodowanych w mtDNA i nie będą mogły uczestniczyć w syntezie ATP. Integracja tych organelli z siecią mitochondrialną poprzez fuzję umożliwi im udział w fosforylacji

substratowej i zwiększenie bioenergetycznej wydolności komórki. Mieszanie i uzupełnianie produktów genowych w połączonych w sieć mitochondriach wydaje się mieć kluczowe znaczenie dla utrzymania funkcji mitochondriów i przeciwdziałaniu starzeniu się komórek. Mitochondrialna teoria starzenia postuluje, że ROS są generowane jako nieuniknione produkty uboczne oddychania, a w nadmiarze wywołują mutacje i uszkodzenia w mtDNA. Postępująca akumulacja mutacji mitochondrialnych związana z wiekiem skutkuje następnie upośledzeniem funkcji mitochondriów, utratą zdolności bioenergetycznej prowadząc do nieprawidłowości i ostatecznie śmierci komórki [Linnane 1989, Balaban i wsp. 2005].

Podczas procesu starzenia w różnych cząsteczkach mtDNA gromadzą się różne mutacje, mtDNA typu dzikiego współistnieje z różnymi zmutowanymi allelami lub delecjami, w stanie określanym jako heteroplazmia. Jeśli poszczególne mitochondria posiadają mutacje w różnych genach, każde mitochondrium będzie niewydolne oddechowo, jeśli jednak te mitochondria ulegają fuzji, każde z ulegających fuzji mitochondriów wniesie nienaruszony allel, a uzupełnienie produktów genowych przywróci aktywność oddechową [Sato i wsp. 2006]. Poparcie dla tezy o komplementarności międzymitochondrialnej w komórkach heteroplazmatycznych uzyskano w badaniach prowadzonych na modelach komórkowych i myszach. W doświadczeniu z wykorzystaniem linii komórek HeLa z upośledzonym oddychaniem komórkowym, skutkiem mutacji w różnych genach mitochondrialnego tRNA wykazano, że hybrydy tych linii komórkowych wykazują przywrócenie oddychania komórkowego po kilku dniach dzięki fuzji mitochondriów [Ono i wsp. 2001]. Podobnie aktywność oddechowa była utrzymywana przez fuzję mitochondriów w modelu mysim (szczep o mtDNA typu dzikiego i zmutowany) [Nakada i wsp. 2001]. Odkrycia te sugerują, że fuzja mitochondriów przyczynia się do utrzymania funkcji mitochondriów w komórkach heteroplazmatycznych, a tym samym stanowi mechanizm obronny przed starzeniem. W niektórych typach komórek fuzja mitochondrialna generuje duże, rozbudowane sieci, które tworzą sprzężone systemy [De Giorgi i wsp. 2000]. Zgodnie z tą hipotezą kompleksy łańcuchów oddechowych generują potencjał błonowy w obszarach komórki bogatych w tlen, a potencjał ten jest następnie przekazywany wzdłuż włókien mitochondrialnych do odległych obszarów komórki, gdzie może być wykorzystany przez syntazę ATP do generowania energii metabolicznej w ubogich w tlen częściach komórki. Można przypuszczać, że wydajne rozpraszanie potencjału błonowego jest szczególnie ważne w dużych komórkach, które mają szczególnie duże zapotrzebowanie na energię, takich jak komórki mięśniowe [Nakada i wsp. 2001]. Wyniki ostatnich badań podkreślają znaczenie fuzji mitochondriów w warunkach

dużego zapotrzebowania na energię u ssaków. Wykazano, że niektóre stresory komórkowe, w tym promieniowanie UV i leki, które hamują syntezę białek cytozolowych, mogą wyzwać zwiększoną fuzję mitochondrialną w mysich embrionalnych fibroblastach, a proces ten jest określany jako hiperfuzja mitochondrialna wywołana stresem. Mitochondria wydłużają się i tworzą siatkę silnie połączonych ze sobą włókien w sposób zależny od Mfn1 i Opa1. Hiperfuzji mitochondrialnej wywołanej stresem towarzyszy zwiększona produkcja mitochondrialnego ATP. Można przypuszczać, że fuzja jest niezbędna do optymalizacji funkcji mitochondriów, aby umożliwić komórce sprostanie zwiększonemu zapotrzebowaniu na energię [Tondera i wsp. 2009]. W mysim modelu neurodegeneracji spowodowanej utratą fuzji mitochondrialnej poprzez celowe usunięcie Mfn2 wykazano, że komórki Purkiniego w mózdzku tych myszy mają nieprawidłowo rozmieszczone mitochondria, zmienioną ultrastrukturę i obniżoną aktywność łańcucha oddechowego [Chen i wsp. 2007]. Podobnie delecja Mfn1 i Mfn2 w mięśniach szkieletowych powoduje poważną dysfunkcję mitochondriów, kompensacyjną proliferację mitochondriów i atrofię mięśni. Defektem tym towarzyszy kumulacja mutacji punktowych i delecji w genomie mitochondrialnym oraz zubożenie mtDNA [Chen i wsp. 2010]. Obserwacje te potwierdzają znaczenie fuzji mitochondriów dla utrzymania intensywnej fosforylacji oksydacyjnej w tkankach o wysokiej aktywności metabolicznej [Nakatogawa i wsp. 2009, Rambold i wsp. 2011, Gomes i wsp. 2011].

2.4.2 Bioenergetyczna rola fizji mitochondriów

Podział mitochondriów pełni wiele różnych funkcji, które obejmują podział i dziedziczenie organelli podczas podziału komórek, uwolnienie cytochromu c i innych białek apoptotycznych, tworzenie mitochondrialnych jednostek dla transportu wzdłuż cytoszkieletu [Westermann 2010]. Chociaż te funkcje nie są bezpośrednio związane z bioenergetyką, to uważa się że rozszczepienie mitochondriów może służyć również do eliminacji uszkodzonych organelli z sieci mitochondrialnej, aby umożliwić ich usunięcie przez autofagię. Ta aktywność prawdopodobnie stanowi mechanizm kontroli i przyczynia się do utrzymania zdolności bioenergetycznej mitochondriów [Twig i wsp. 2008a, 2008b]. Obserwacja znakowanych fluorescencyjnie mitochondriów w hodowlach komórek ssaków ujawniła, że podział mitochondriów często generuje dwie nierówne organelle potomne, jedną o wysokim potencjale błonowym, a drugą o obniżonym potencjale błonowym. Wykazano także, że mitochondria o niskim potencjale błonowym mają obniżoną ekspresję białka fuzyjnego błony wewnętrznej Opa1, a zatem jest mniej prawdopodobne, że ulegną ponownej fuzji z siecią

mitochondrialną. Zamiast tego te dysfunkcyjne mitochondria są usuwane z komórki na drodze autofagii [Twig i wsp. 2008a, 2008b].

Podsumowując wydaje się, że rozszczepienie mitochondriów, po którym następuje selektywna fuzja, zapewnia mechanizm segregacji uszkodzonych i dysfunkcyjnych mitochondriów oraz umożliwia ich degradację na drodze autofagii. Mechanizm ten przyczynia się do utrzymania zdrowej populacji mitochondriów i zachowania ich zdolności bioenergetycznej.

2.4.3 Adaptacja dynamiki mitochondrialnej do warunków bioenergetycznych

Wykazano dotychczas co najmniej trzy możliwe procesy molekularne, które mają wpływ na fuzję i fragmentację mitochondriów oraz dostosowanie tych procesów do stanu energetycznego komórki: (1) aktywność mechanizmu fuzji mitochondriów może bezpośrednio odpowiadać na stan energetyczny mitochondriów (2) kilka komórkowych szlaków sygnałowych moduluje aktywność białek fuzyjnych i fizyjnych (3) ekspresja kluczowych czynników dynamiki mitochondriów jest regulowana na poziomie transkrypcji.

Stwierdzono dotychczas, że mutanty drożdży z upośledzeniem oddychania komórkowego mają typ dziki morfologii mitochondriów [Dimmer i wsp. 2002], co sugeruje, że fuzja mitochondriów jest w stanie utrzymać przynajmniej część aktywności, podczas gdy potencjał błony mitochondrialnej jest zmniejszony. Podobnie aktywnie zachodzącą fuzję mitochondriów w komórkach ssaków można zaobserwować przy braku funkcjonalnego łańcucha oddechowego lub po istotnym obniżeniu stężenia ATP w komórce [Legros i wsp. 2002]. Jednak rozproszenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej eliminuje całkowicie fuzję mitochondriów u drożdży *in vitro*, a w komórkach ssaków fuzja jest silnie hamowana przez traktowanie protonoforami, które rozpraszają potencjał błony mitochondrialnej [Legros i wsp. 2002, Ishihara i wsp. 2003], co wskazuje, że proces ten wymaga utrzymania wysokiej wartości potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej. Ponieważ ekspresja izoform białka Mgm1 w drożdżach i jego homologu Opa1 u ssaków jest zależna od stanu bioenergetycznego mitochondriów [Herlan i wsp. 2004, Twig i wsp. 2008a, 2008b] można przypuszczać, że białka te odgrywają kluczową rolę w adaptacji aktywności fuzji mitochondrialnej w odpowiedzi na zmiany potencjału błony mitochondrialnej.

Wykazano także, że liczne szlaki sygnalizacji komórkowej regulują dynamikę mitochondriów u drożdży i w komórkach ssaków. Szlaki sygnalizacyjne pośredniczą w ubikwitylacji, fosforylacji, nitrozytacji lub proteolitycznym przetwarzaniu kluczowych

składników mechanizmu syntezy i rozszczepienia mitochondriów w odpowiedzi na cykl komórkowy, patologiczne zmiany w komórkach, indukcję śmierci komórki lub inne zewnątrzkomórkowe sygnały [Cervený i wsp. 2007, Benard i wsp. 2007, Carlucci i wsp. 2008, Benard i wsp. 2009, Palmer i wsp. 2011]. Wykazano, że białko Drp1 jest regulowane przez kinazę białkową zależną od cAMP (PKA) [Carlucci i wsp. 2008], która fosforyluje białko na konserwatywnej reszcie seryny [Dimmer i wsp. 2002, Meeusen i wsp. 2004, Ishihara i wsp. 2003]. Zaobserwowano także, że fuzja mitochondriów w okresie głodu zależy od fosforylacji Drp1 przez PKA [Gomes i wsp. 2011] i że fragmentacja mitochondriów pod wpływem hipoksji jest kontrolowana przez obniżenie zależnej od PKA fosforylacji Drp1 [Cribbs i wsp. 2007, Chang i wsp. 2007]. Zatem precyzyjne dostrojenie aktywności Drp1 przez PKA ma kluczowe znaczenie dla adaptacji dynamiki mitochondriów do metabolizmu komórek ssaków. Należy jednak zauważyć, że białko to może również podlegać innym złożonym modyfikacjom potranslacyjnym i regulacji transkrypcji przez kinazy białkowe, fosfatazy, ligazy SUMO, proteazy SUMO i ubikwitynę [Santel i wsp. 2008, Chang i wsp. 2010, Kim i wsp. 2011].

Podsumowując, fuzja i fragmentacja mitochondriów są procesami antagonistycznymi, dzięki którym zależnie od warunków zachodzi dostosowanie morfologii mitochondriów do bioenergetycznych wymagań komórki (Ryc. 1). Fuzja mitochondriów preferowana jest, gdy wymagana jest optymalna aktywność mitochondrialna, w związku z czym zachodzi często w komórkach prowadzących aktywnie procesy oddychania komórkowego. Fuzja matrix i błony wewnętrznej mitochondriów pozwala na najbardziej efektywną współpracę elementów łańcucha oddechowego. Co więcej, fuzja angażuje cały obszar, który w komórce zajmuje mitochondrium, aby zmaksymalizować syntezę ATP. Można przypuszczać, że nagłe zapotrzebowanie na energię metaboliczną powoduje hiperfuzję i tworzenie sieci mitochondriów, co może mieć miejsce przy ekspozycji komórek na stres oraz że fuzja optymalizuje funkcje mitochondriów w komórce warunkach głodu. Oprócz tego, że fuzja w komórkach narażonych na stres lub głód stanowi krótkoterminową adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych, wpływa ona również korzystnie na utrzymanie bioenergetycznej wydolności w dłuższym czasie. W procesie starzenia fuzja umożliwia komplementarność produktów genowych i w ten sposób kompensuje nagromadzenie mutacji mitochondrialnych w komórkach heteroplazmatycznych. Ponadto, fuzja i tworzenie sieci mitochondriów przyczynia się do rozpraszania energii w dużych komórkach o szczególnie wysokim zapotrzebowaniu na energię. Z kolei pofragmentowane

mitochondria występują często w komórkach w znajdujących się stanie spoczynku i mogą stanowić "domyślny" stan morfologiczny, gdy nie jest wymagana wysoka aktywność oddechowa. Mechanizm fragmentacji mitochondriów przyczynia się do utrzymania aktywności bioenergetycznej, ponieważ pozwala na eliminację (na drodze autofagii) nieodwracalnie uszkodzonych mitochondriów. Aktywność kluczowych białek mitochondrialnych jest regulowana na wielu poziomach, w tym poprzez transkrypcję, modyfikacje potranslacyjne oraz w bezpośrednią odpowiedź na zapotrzebowanie energetyczne komórki.

2.5. Metaboliczna regulacja dynamiki mitochondriów

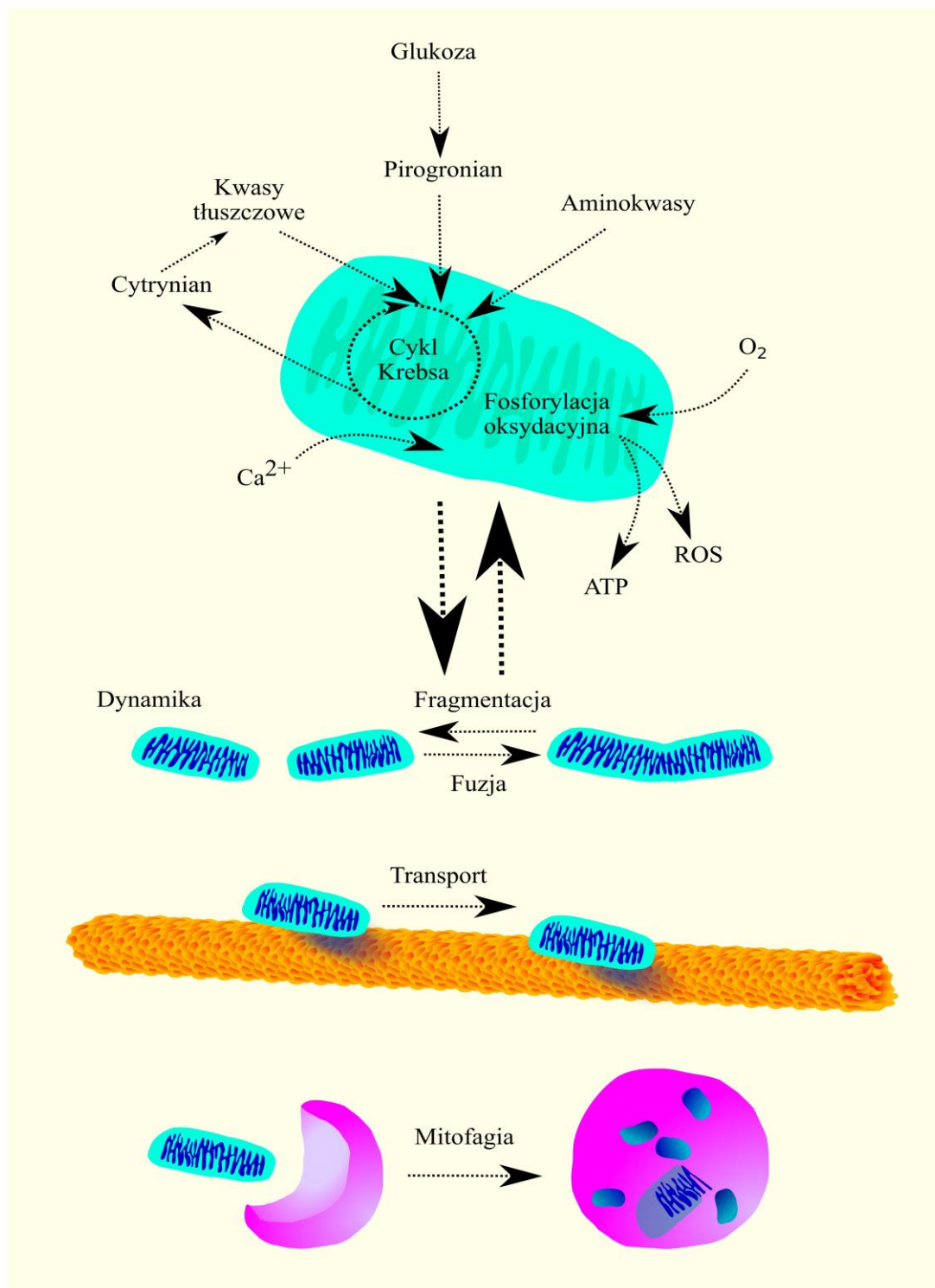
Jako miejsce zachodzenia wielu procesów biochemicznych, w tym fosforylacji oksydacyjnej, cyklu Krebsa, β -oksydacji kwasów tłuszczowych, gospodarki wapniowej Ca^{2+} i biosyntezy hemu - mitochondria odgrywają kluczową rolę w metabolizmie. Skutkiem tego, zaburzenie funkcji mitochondriów, a zwłaszcza w ich aktywności metabolicznej wiąże się z wieloma nieprawidłowościami, w tym chorobami metabolicznymi i neurodegeneracyjnymi, nowotworami, a także z procesem starzenia [Carelli i wsp. 2014, Lightowlers i wsp. 2015].

Mitochondria charakteryzuje duża dynamika istotna zarówno w fizjologii, jak i w stanach chorobowych [Labbé i wsp. 2014, Mishra i wsp. 2016]. Ponieważ równowaga między fuzją i fuzją kontroluje morfologię mitochondriów, delecja genów fuzyjnych skutkuje jak wspomniano wcześniej fragmentacją sieci mitochondrialnej i znosi wymianę zawartości mitochondriów [Chen i wsp. 2003, Chen i wsp. 2005]. U ludzi mutacje Mfn2 powodują chorobę Charcota-Marie-Tootha typu 2A, obwodową neuropatię wpływającą na motoneurony ruchowe i czuciowe [Züchner i wsp. 2004]. Mutacje w Opa1 powodują w sposób dominujący zanik nerwu wzrokowego, ślepotę spowodowaną degeneracją komórek zwojowych siatkówki [Alexander i wsp. 2000, Delettre i wsp. 2000, Delettre i wsp. 2002].

Wiadomo, że proces fuzji jest ważny dla przebiegu i aktywności fosforylacji oksydacyjnej, szczególnie poprzez regulację ekspresji mtDNA. Wrażliwość komórek na obniżoną fuzję mitochondrialną może być zróżnicowana, jak to wykazano w mysich embrionalnych fibroblastach, które mogą tolerować brak ekspresji Mfn1 lub Mfn2 bez większych konsekwencji w metabolizmie energetycznym tych komórek. Natomiast dla neuronów Purkinjego w mózdzku usunięcie Mfn2 staje się letalne z powodu utraty aktywności łańcucha oddechowego [Chen i wsp. 2007]. Całkowita utrata fuzji

mitochondrialnej spowodowana usunięciem zarówno mitofuzyn lub Opa1 powoduje istotny spadek zawartości mtDNA i obniżenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej oraz hamowanie aktywności łańcucha oddechowego w hodowlach komórek i tkankach myszy [Chen i wsp. 2005, Chen i wsp. 2010].

Wykazano także, że białka związane z fuzją mitochondriów mają wpływ na metabolizm komórki. Stwierdzono, że białko Mfn2 wpływa na stężenie koenzymu Q [Mourier i wsp. 2015], a białko Opa1 utrzymuje strukturę grzebieni mitochondrialnych oraz ma kluczowe znaczenie dla tworzenia białkowych kompleksów łańcucha oddechowego [Cogliati i wsp. 2013].



Rycina 2. Metabolizm i dynamika mitochondriów. Mitochondria odgrywają kluczową rolę w metabolizmie energetycznym komórki, uczestniczą w biosyntezie i katabolizmie wielu związków, w generowaniu i przekazywaniu sygnałów w komórce. Wykazują dużą dynamikę podlegając fuzji, rozszczepieniu, transportowi i mitofagii. Metabolizm i dynamika mitochondriów są silnie ze sobą związane i podlegają wzajemnej regulacji.

Stan energetyczny komórek jest związany z określoną morfologią mitochondriów. W hodowlach komórek drożdży w warunkach, które wymuszają zwiększoną aktywność fosforylacji oksydacyjnej obserwuje się tworzenie rozbudowanej sieci mitochondrialnej [Egner i wsp. 2002, Jakobs i wsp. 2003]. Analogiczne badanie przeprowadzone na ludzkich komórkach wykazało, że mitochondria wydłużają się podczas wzrostu w pożywce galaktozowej, co zmusza komórki do produkcji ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej [Rossignol i wsp. 2004]. Wydłużone mitochondria obserwowano również w innych stanach związanych ze zwiększoną produkcją ATP [Mitra i wsp. 2009, Tondera i wsp. 2009]. Te obserwacje sugerują, że wysoka aktywność fosforylacji oksydacyjnej koreluje z wydłużaniem mitochondriów, które są bardziej wydajne w wytwarzaniu energii i zdolne do dystrybucji energii na duże odległości [Skulachev 2001]. Wykazano, że nasilenie fosforylacji oksydacyjnej stymuluje także fuzję i rozbudowę sieci mitochondrialnej [Meeusen i wsp. 2004, Hoppins i wsp. 2011]. W izolowanych mitochondriach zaobserwowano ponadto, że dodanie substratów łańcucha oddechowego, które nasiliło fosforylację oksydacyjną prowadzi do stymulacji mitochondrialnej fuzji mitochondrialnej błony wewnętrznej [Mishra i wsp. 2014a]. Aktywność fosforylacji stymuluje białko Yme1L do proteolitycznego przetwarzania białka Opa1, prowadząc do aktywacji jego aktywności fuzyjnej. Opa1 ulega ekspresji jako długołańcuchowe białko zintegrowane z membraną, które następnie może zostać rozszczepione do rozpuszczalnej, krótkołańcuchowej formy przez dwie różne metaloproteazy - zależną od ATP proteazę Yme1L i zależną od potencjału błonowego proteazę Oma1. Wykazano, że ekspresja zarówno długo- jak i krótkołańcuchowych form białka Opa1 była skorelowana z mitochondriami zdolnymi do fuzji [Song i wsp. 2007]. Stwierdzono także, że w mitochondriach, w których doszło do fuzji zewnętrznej błony mitochondrialnej, proteolityczna obróbka białka Opa1 w miejscu rozszczepienia przez proteazę Yme1L lub Oma1 była wystarczająca do stymulacji fuzji błony wewnętrznej [Mishra i wsp. 2014a, Mishra i wsp. 2014b]. Obróbka Opa1 przez dwie proteazy umożliwia zróżnicowaną regulację fuzji błony wewnętrznej. Proteoliza przez Yme1L jest odpowiedzialna za zależną od fosforylacji oksydacyjnej stymulację fuzji błony wewnętrznej (Ryc. 2). W przeciwieństwie do tego, gdy potencjał błonowy jest rozproszony, długołańcuchowa izoforma białka Opa1 jest całkowicie rozszczepiana i inaktywowana [Ishihara i wsp. 2003, Ishihara i wsp. 2006] w wyniku aktywacji Oma1 [Ehse i wsp. 2009]. Wykazano, że różne czynniki wywołujące stres w komórkach mogą aktywować proteazę Oma1 w celu rozszczepienia białka Opa1 [Baker i wsp. 2014]. Mechanizm ten prawdopodobnie przyczynia się do fragmentacji mitochondriów

występującej w wielu formach upośledzenia funkcji mitochondriów [Duvezin-Caubet i wsp. 2006].

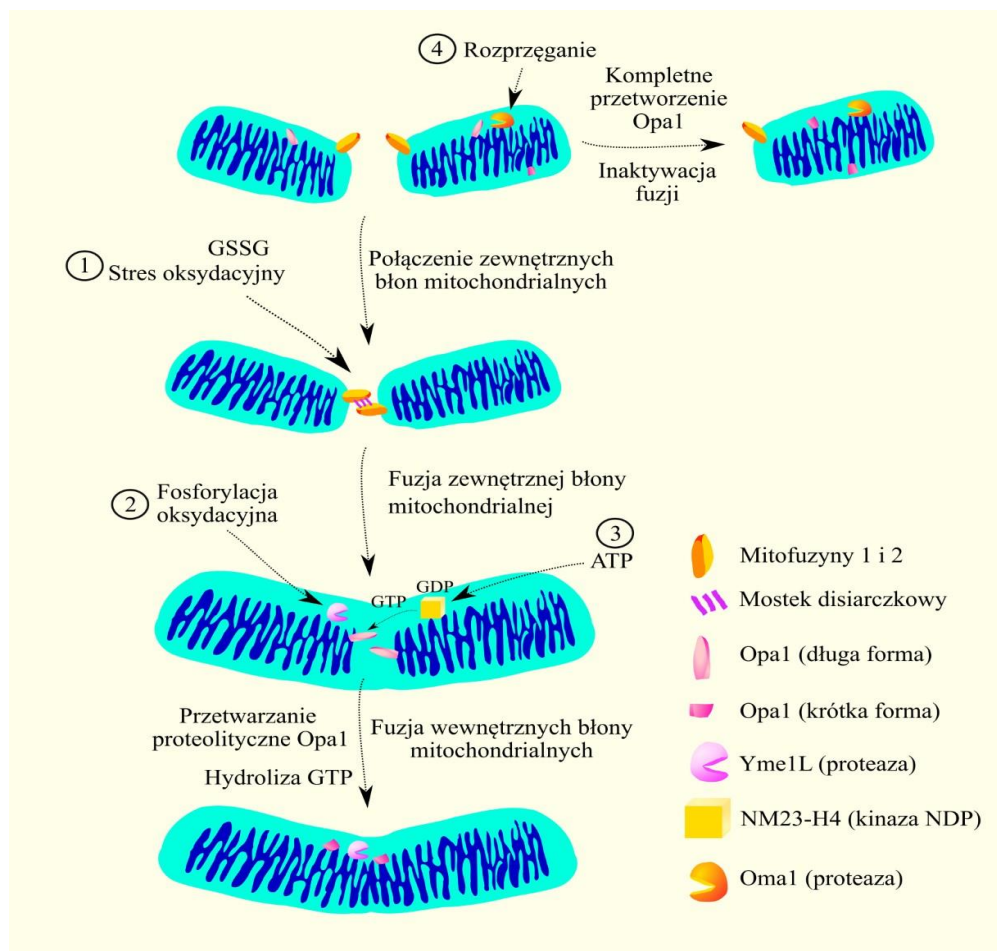
Wykazano, że długotrwałe obniżenie potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej inaktywuje białko Opa1, natomiast krótkotrwała depolaryzacja może częściowo aktywować Oma1 i przyczynić do fuzji mitochondriów [Santo-Domingo i wsp. 2013]. Należy zauważyć, że komórki pozbawione proteaz Yme1L i Oma1 zachowują bardzo słabą aktywność fuzji mitochondrialnej [Anand i wsp. 2014]. Jednakże niezbędne jest przeprowadzenie dodatkowych badań w celu wyjaśnienia jak regulowana jest fuzja błony wewnętrznej w tych warunkach. Dotychczas wskazuje się, że warunki, które zwiększają produkcję mitochondrialnego ATP prowadzą do wzmożonej fuzji, podczas gdy czynniki metaboliczne, które wpływają na obniżenie potencjału mitochondriów powodują zahamowanie fuzji. Te czynniki regulacyjne wydają się odgrywać kluczową rolę w warunkach fizjologii jak i patologii.

Włókna mięśni szkieletowych prowadzące intensywne przemiany tlenowe wykazują nasiloną fuzję mitochondrialną, w ten sposób zachowując na wysokim poziomie populację mitochondriów o wysokim potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej [Mishra i wsp. 2015]. W chorobach mitochondrialnych wykazano, że upośledzenie funkcji łańcucha oddechowego i fosforylacji oksydacyjnej wynikające z mutacji w mtDNA skutkuje wtórnymi defektami w mitochondrialnej fuzji błony wewnętrznej [Mishra i wsp. 2014a, Mishra i wsp. 2014b]. Ten proces regulacyjny może pomóc w segregacji dysfunkcyjnych mitochondriów i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się mutacji mtDNA do mitochondriów typu dzikiego. W przypadku mięśni szkieletowych połączenie fuzji z aktywnością fosforylacji oksydacyjnej może służyć ograniczeniu defektów mtDNA do małego obszaru włókna mięśniowego, co stwierdzono u osób starszych i niektórych pacjentów z miopatią mitochondrialną [Elson i wsp. 2002, Bua i wsp. 2006]. Ponadto niezdolność uszkodzonych mitochondriów do fuzji z resztą populacji mitochondriów zapewnia ich oddzielenie i ułatwia ich zniszczenie poprzez autofagię [Twig i wsp. 2008a, Twig i wsp. 2008b].

Zaproponowano również inne mechanizmy metaboliczne regulujące fuzję mitochondrialną (Ryc. 3). Jedym z nich jest stres oksydacyjny, który może nasilać fuzję zarówno izolowanych mitochondriów, jak tych obecnych w komórkach. W warunkach stresu podwyższony poziom utlenionego glutationu sprzyja dimeryzacji cząsteczek mitofuzyny za pośrednictwem wiązań dwusiarczkowych, co jest pierwszym krokiem w procesie fuzji [Shutt i wsp. 2012]. Aktywność Mfn1 jest również regulowana przez fosforylację przez kinazę

białkową aktywowaną mitogenem (MAPK) łączącą szlak MAPK z fuzją mitochondrialną [Pyakurel i wsp. 2015]. Inne badania sugerują, że fuzję może kontrolować lokalne stężenie GTP. NM23-H4 jest kinazą disfosforanów nukleotydów zlokalizowaną w mitochondriach, która może generować GTP (z GDP) w obecności ATP. Co ciekawe, NM23-H4 może promować przyłączenie GTP do białka Opa1, a knockdown NM23-H4 prowadzi do upośledzenia fuzji, których skutki przypominają knockdown Opa1 [Boissan i wsp. 2014]. Przymuszczalnie ten mechanizm pozwala na powiązanie stężenia ATP w komórce z fuzją mitochondrialną poprzez łączenie Opa1 przez GTP.

Podsumowując, wiele etapów procesu fuzji może być niezależnie ukierunkowanych za pośrednictwem różnych mechanizmów regulacyjnych, potencjalnie zapewniających wysoki poziom kontroli nad procesem fuzji mitochondrialnej.



Rycina 3. Regulacja metaboliczna fuzji mitochondrialnej. Na proces fuzji mitochondriów składa się fuzja błony zewnętrznej, w której pośredniczą mitofuzyny, a następnie fuzja błony wewnętrznej, w której pośredniczy białko Opa1. Mechanizm regulacji obejmuje: (1) Stres oksydacyjny i wysoki poziom utlenionego glutationu (GSSG), które sprzyjają tworzeniu kompleksów trans mitofuzyn, wspomaganym przez wiązania dwusiarczkowe prowadząc do wiązania organelli i zwiększonej fuzji błony zewnętrznej. (2) Fuzja błony wewnętrznej jest stymulowana przez aktywność fosforylacji oksydacyjnej, która zwiększa proteolityczne przetwarzanie Opa1 (z formy długołańcuchowej do rozpuszczalnej formy krótkołańcuchowej), w którym

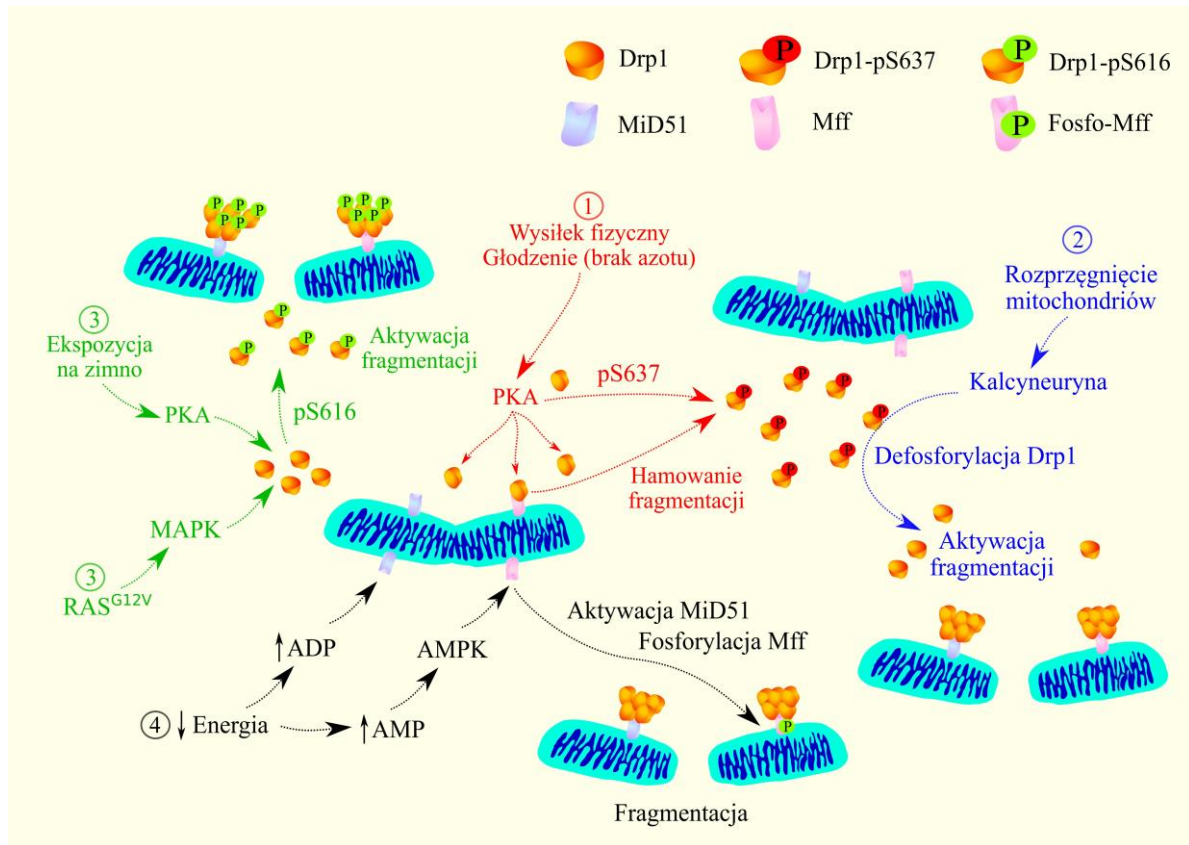
pośredniczy białko Yme1L. (3) Podwyższony poziom ATP jest potencjalnie powiązany z przyłączeniem GTP Opa1 poprzez kinazę nukleotydów difosforanowych NM23-H4. Przyłączenie GTP i hydroliza przez Opa1 są wymagane do fuzji wewnętrznej membrany. (4) Stresy metaboliczne, w tym utrata potencjału wewnętrznej błony mitochondrialnej aktywuje proteazę błony wewnętrznej Oma1 i skutkuje całkowitym proteolitycznym przetwarzaniem Opa1.

2.5.1 Kontrola metaboliczna fragmentacji mitochondriów

Jak wspomniano wcześniej fragmentacja mitochondriów wymaga aktywności białka Drp1, GTPazy, która jest rekrutowana do zewnętrznej błony mitochondrialnej poprzez białka receptorowe (Mff, Fis1, MiD49 i MiD50). W mitochondriach Drp1 gromadzi się wokół tubuli i obkurcza je w sposób zależny od GTP, aby pośredniczyć w cięciu. Oprócz wpływania na morfologię mitochondriów, fragmentacja mitochondriów służy ponadto ułatwieniu transportu mitochondriów, mitofagii i apoptozie. Badania kliniczne pozwoliły ustalić związek między mutacją Drp1 a śmiertelnym małogłowie u noworodków [Waterham i wsp. 2007] i oporną na leczenie padaczką [Vanstone i wsp. 2015]. W innych badaniach wykazano związek mutacji w białku Mff z przypadkami opóźnienia rozwojowego z dysfunkcją nerwowomięśniową [Shamseldin i wsp. 2012]. Najbardziej znany mechanizm regulacyjny fragmentacji mitochondriów obejmuje, jak wcześniej wspomniano, fosforylację białka Drp1. Zidentyfikowano wiele miejsc fosforylacji oraz kinaz biorących udział w tej regulacji, związanych ponadto ze szlakami sygnałowymi aktywowanymi przez czynniki metaboliczne. Ponadto fosforylacja może aktywować lub hamować Drp1, a tym samym nasilać tworzenie lub spowalniać fragmentację sieci mitochondrialnej.

Badania nad fosforylacją Drp1 skupiły się na serynie 616 (S616) i S637 w oparciu o sekwencję izoformy 1 ludzkiego Drp1. Wykazano, że przyłączenie grupy fosforanowej do reszty seryny 637 przez kinazę białkową A (PKA) na S637 hamuje przyłączenie do mitochondriów, promując wydłużenie sieci mitochondrialnej w odpowiedzi na aktywację farmakologiczną (np. forskolinę), stymulację β -adrenergiczną lub intensywny wysiłek fizyczny (Ryc. 4) [Chang i wsp. 2007, Cribbs i wsp. 2007]. Fosforylacji na S637 przeciwdziałają fosfatazy kalcyneuryna [Cribbs i wsp. 2007; Cereghetti i wsp. 2008] i PP2A / B β 2 [Dickey i wsp. 2011]. Regulacja negatywna Drp1 przez fosforylację na S637 występuje również podczas zahamowania aktywności szlaku mTOR i w czasie niedostatecznego dostarczania azotu, co zwiększa poziomy cAMP i aktywuje PKA [Gomes i wsp. 2011, Rambold i wsp. 2011]. W warunkach głodu, nawet jeśli dochodzi do aktywowania autofagii, hamowana jest również aktywność białka Drp1, co skutkuje nasileniem fuzji

mitochondrialnej, promuje mitochondrialną produkcję ATP i chroni mitochondria przez degradacją. Rozszczepieniu natomiast sprzyja defosforylacja Drp1 na serynie 637 poprzez zależną od Ca^{2+} kalcyneurynę, co wspomaga aktywację Drp1 i rekrutację do powierzchni mitochondriów (Fig. 4), [Cribbs i wsp. 2007, Cereghetti i wsp. 2008]. Zaobserwowano, że zastosowanie substancji rozprzegających potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej powoduje silną i szybką fragmentację sieci mitochondrialnej stymulując białko Oma1 do rozszczepiania Opa1, a tym samym powodując inaktywację fuzji mitochondrialnej.



Rycina 4. Regulacja metaboliczna fizji mitochondriów.

Głównym regulatorem fragmentacji mitochondriów jest białko Drp1, które ulega rekrutacji z puli cytozolowej na powierzchnię mitochondriów. Do rekrutacji Drp1 i rozpoczęcia fragmentacji konieczne jest również białko receptorowe na zewnętrznej błonie mitochondrialnej (na rycinie pokazane zostały tylko dwa białka receptorowe Mff i MiD51). Cztery możliwe szlaki regulacyjne zaznaczono na schemacie (1) Skutkiem działania intensywnego wysiłku fizycznego i głodzenia (brak azotu) następuje aktywacja PKA, po której następuje fosforylacja Drp1 na Ser637, która hamuje fragmentację mitochondriów z powodu zatrzymania Drp1 w cytozolu. (2) Defosforylacja S637 może być wywołana kalcyneuryną, która jest aktywowana przez metaboliczne rozprzęgnięcie mitochondriów, co prowadzi do rekrutacji Drp1 i szybkiej aktywacji rozszczepienia. (3) Ekspozycja na zimno i onkogenny Ras^{G12V} aktywuje fragmentację poprzez fosforylację Ser616 odpowiednio przez PKA lub MAPK. (4) Obniżenie ilości energii może potencjalnie aktywować rozszczepienie poprzez podniesienie poziomów ADP i AMP. Wiązanie ADP z receptorem MiD51 jest niezbędne do rekrutacji Drp1 i fragmentacji. Wykrycie AMP przez AMPK powoduje fosforylację Mff i aktywację fragmentacji.

Kalcyneuryna zatem przekazuje sygnały metaboliczne związane ze zmianami stężenia wapnia na zmiany w morfologii mitochondriów. Zaburzenie aktywności mitochondriów w zakresie buforowania wapnia może zwiększyć cytozolowe poziomy wapnia i potencjalnie wywołać fragmentację mitochondriów za pośrednictwem kalcyneuryny. Ponadto wykazano, że myszy pozbawione kalcyneuryny w mięśniach szkieletowych wykazują obecność wydłużonych mitochondriów, zwiększoną aktywność łańcucha oddechowego, odporność na otyłość na diecie wysokotłuszczowej i zmniejszoną wydolność do wysiłku fizycznego [Pfluger i wsp. 2015].

W brązowej tkance tłuszczowej, w której zachodzi termogeneza bezdrzeniowa obserwowano aktywację Drp1 i fragmentację mitochondriów. Stymulacja zimnem powoduje w tych komórkach utlenianie kwasów tłuszczowych w niesprzężonych mitochondriach w celu zwiększenia produkcji ciepła, a nie syntezy ATP. Ekspozycja na zimno powoduje uruchomienie sygnału pochodzącego od adrenaliny, aktywację PKA i fosforylację Drp1 w S616, która aktywuje fragmentację mitochondriów (Ryc. 4), [Wikstrom i wsp. 2014]. Fragmentacja mitochondriów zwiększa ich wrażliwość na kwasy tłuszczowe (w nieznanym dotąd mechanizmie) wspomagając w ten sposób wytwarzanie ciepła. Zatem mechanizmy wzmacniające fragmentację mitochondriów mogą zmniejszać wydajność fosforylacji oksydacyjnej i mogą być przydatne w okresach nadmiaru składników odżywczych w komórce, aby je intensywniej metabolizować [Wikstrom i wsp. 2014].

Fosforylacja Drp1 na S616 może być również zaangażowana w działanie kancerogenne przez onkogenne Ras (Ryc. 3), [Kashatus i wsp. 2015]. Regulacja w górę szlaku MAPK przez Ras indukuje bowiem fosforylację Drp1 w S616, w której pośredniczy Erk1, co skutkuje nasileniem fragmentacji mitochondriów. Hamowanie funkcji Drp1 osłabia aktywność onkogeną Ras w hodowlach komórek i ksenoprzeszczepów nowotworowych. Dotychczas nie ustalono jednak, jaką rolę w metabolizmie komórek nowotworowych odgrywa mitochondrialna dynamika. Regulacja fragmentacji mitochondriów może również zachodzić na poziomie białek receptorowych Drp1. W hodowlach komórek, takim celem wydaje się być Mff, ponieważ utrata Mff prowadzi do gwałtownego wydłużenia mitochondriów [Otera i wsp. 2010, Losón i wsp. 2013]. Ostatnie badania pokazują, że Mff jest substratem fosforylacji dla kinazy AMP (AMPK). Fosforylacja aktywuje Mff i fragmentację mitochondriów, wyjaśniając w jaki sposób AMPK łączy niedobór energii z ich fragmentacją (Ryc. 4). Można przypuszczać, że podobną rolę w regulacji metabolizmu może odgrywać białko MiD51 [Losón i wsp. 2014]. Domena cytozolowa tego receptora jest

wrażliwa na enzymatycznie nieczynny fragment nukleotydylotransferazy, który zawiera miejsce wiązania dinukleotydów ADP i GDP o wysokim powinowactwie. Wykazano, że związanie dinukleotydów jest wymagane do działania receptora, służąc jako czujnik poziomów ADP. Zatem MiD51 potencjalnie wiąże warunki metaboliczne z fragmentacją mitochondriów (Ryc. 4). Dla receptora MiD49 nie stwierdzono tego sposobu regulacji, ponieważ nie wiąże nukleotydów pomimo obecności podobnej domeny i miejsca wiążącego [Losón i wsp. 2014]. Nie wiadomo także, czy MiD49 wiąże inne klasy ligandów, które mogą regulować jego aktywność.

2.5.2 Kontrola metaboliczna mitofagii

Ogólna masa mitochondriów w komórce jest prawdopodobnie regulowana poprzez równowagę między biogenezą a degradacją. Kiedy mitochondria występują w nadmiarze, starzeją się lub ulegają uszkodzeniu, ich pozbywanie się z komórki zachodzi głównie w wyniku autofagii, w przypadku mitochondriów określanym jako mitofagia. Usunięcie mitochondriów może być przypadkowe lub selektywne. Podczas autofagii masowej degradacja mitochondriów jest częścią uogólnionego programu autofagii, aktywowanego przez stan metaboliczny komórki. W innych przypadkach mitofagia jest procesem, który selektywnie degraduje tylko wadliwe mitochondria, utrzymując w ten sposób ogólny stan populacji mitochondrialnej.

Najlepiej zbadany szlak mitofagii obejmuje geny Pink1 i Parkin odpowiedzialne za niektóre przypadki rodzinnej choroby Parkinsona. Pink1, kinaza zlokalizowana w mitochondriach, jest normalnie importowana i degradowana w mitochondriach. Ponieważ import białek zależy od potencjału błony mitochondrialnej, depolaryzacja prowadzi do akumulacji Pink1 na błonie zewnętrznej [Narendra i wsp. 2010]. Nagromadzone białko Pink1 fosforyluje liczne białka, w tym ubikwitynę, w celu rekrutacji i aktywacji Parkiny, ligazy E3 [Okatsu i wsp. 2015]. Aktywowane białko Parkin powoduje powszechną ubikwitynację mitochondrialnych białek błony zewnętrznej, których degradacja przez proteasom 26S [Sarraf i wsp. 2013] jest wymagana do kierowania mitochondrium do błon autofagicznych. Ponieważ Parkin jest selektywnie wzbogacany w dysfunkcyjnych mitochondriach, zdrowe organelle są chronione przed autofagiczną degradacją. Pink1 i Parkin są również zaangażowane w inny szlak kontroli jakości mitochondriów, różny od autofagii, w którym pęcherzyki pączkują z mitochondriów i są przemieszczane do późnego endosomu i lizosomu [Sugiura i wsp. 2014].

Mitofagia może być aktywowana pod wpływem niektórych stresorów komórkowych. W przypadku stresu energetycznego aktywacja AMPK powoduje fosforylację białek ULK1 i ULK2, kinaz białkowych ssaków, które są homologami genu autofagii ATG1 [Egan i wsp. 2011]. ULK1 i ULK2 sprzyjają autofagii, w tym degradacji mitochondriów. AMPK hamuje również aktywację szlaku mTORC, który normalnie hamuje funkcję białek ULK. Te wzajemnie powiązane mechanizmy łączą mitofagię ze stanem energetycznym komórki.

Stany niedotlenienia mogą również wywołać mitofagię poprzez odrębny mechanizm. Aktywacja fosfatazy mitochondrialnej PGAM5 powoduje defosforylację mitochondrialnego receptora autofagii, FUNDC1. Defosforylacja sprzyja interakcji FUNDC1 z ATG8 (znanym również jako LC3), stymulując tworzenie się błony autofagicznej [Chen i wsp. 2014]. Nie jest jasne, jak niedotlenienie aktywuje PGAM5 i czy ten mechanizm jest selektywny dla poszczególnych mitochondriów. Wykazano także, że warunki metaboliczne, które sprzyjają nasileniu aktywności mitochondriów, mogą również sprzyjać mitofagii [Melser i wsp. 2013].

Wskazywany jest również mechanizm, w którym zaangażowane jest małe białko GTPaza Rheb oddziałujące z mitochondrialnym receptorem autofagii Nix. Zakotwiczenie Rheb do zewnętrznej błony mitochondrialnej w warunkach intensywnych przemian oksydacyjnych w komórce sprzyja rekrutacji białka LC3, wzmacniając w ten sposób mitofagię. Sygnały molekularne, które rekrutują Rheb, są dotychczas niejasne. Promowanie mitofagii w warunkach oksydacyjnych wydaje się kontrastować z wcześniejszymi modelami mitofagii, w których dysfunkcyjne organelle są usuwane. Jednak zwiększona aktywność łańcucha oddechowego może sprzyjać uszkodzeniu mitochondriów (np. poprzez zwiększoną produkcję ROS) i jest możliwe, że Rheb reaguje specyficznym na te uszkodzone mitochondria. Alternatywnie, ten mechanizm może być zastosowany w celu zwiększenia rotacji populacji mitochondriów w warunkach zwiększonego zapotrzebowania funkcjonalnego. W obu przypadkach zwiększona mitofagia sprzyja ogólnej wydajności energetycznej całej puli komórkowej mitochondriów [Chen i wsp. 2014].

2.6. Biogeneza mitochondriów

Homeostaza mitochondriów może być zachowana dzięki koordynacji między dwoma przeciwstawnymi procesami: wytwarzaniem nowych mitochondriów przez biogenezę i usuwaniem uszkodzonych mitochondriów przez mitofagię. Proces biogenezy mitochondriów zachodzi głównie w zdrowych komórkach, jednakże wykazano także że proliferacja i migracja komórek nowotworowych może być skorelowana z biogenezą mitochondriów

[LeBleu i wsp. 2014]. Proces biogenezy wymaga współpracy między genomem mitochondrialnym i jądrowym, jest wieloetapowy i angażuje:

1) Transkrypcję i translację mitochondrialnego DNA. Transkrypcja mitochondrialnego DNA jest aktywowana przez rodzinę białek PGC-1 (PGC-1 α , PGC-1 β i PGC-1), z którego PGC-1 α (białko koaktywatora 1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator*) uważany jest za główny regulator biogenezy mitochondrialnej.

Szlak jest inicjowany przez aktywację PGC-1 α (przez fosforylację lub deacetylację), po której następuje stymulacja szeregu jądrowych czynników transkrypcyjnych, tj. ang. *nuclear respiratory factor 1* (NRF-1), ang. *nuclear respiratory factor 2* (NRF-2) i ang. *estrogen related receptor- α* (ERR- α), a w końcu poprzez wzrost ekspresji ang. *mitochondrial transcription factor* (TFAM), końcowego efektora transkrypcji i replikacji mitochondrialnego DNA [Cameron i wsp. 2016, Cameron i wsp. 2017, Dos Santos i wsp. 2018].

Następnie translacja genów kodowanych przez mDNA na białka odbywa się za pomocą specyficznych czynników translacji (kodowanych przez jądrowy DNA), takich jak ang. *initiation factor 2 and 3* (mtIF2 i mtIF3), ang. *elongation factors* Tu, Ts i G1 (mtEFTu, mtEFTs i mtEFG1), ang. *translational release factor1-like* (mtRF1L) i ang. *recycling factors* (mtRRF1 i mtRRF2).

Ponadto poziomy białek mitochondrialnych są regulowane przez aktywator translacji oksydazy cytochromu c1 (TACO1), który wiąże mitochondrialne mRNA [Yokokawa i wsp. 2018].

2) Syntezę, import i łączenie białek mitochondrialnych kodowanych przez jądrowe DNA.

Białka mitochondrialne pochodzą z prebiałek syntetyzowanych w cytozolu i dostarczanych z sygnałem kierującym na końcu aminowym umożliwiającym rozszczepienie. Translokaza TIM23 kieruje sygnał prebiałek w kierunku macierzy mitochondrialnej, gdzie białka gromadzą się i są sortowane w kierunku macierzy lub wewnętrznej błony mitochondrialnej. Energię potrzebną do kierowania tą ścieżką importu zapewnia ATP wytworzone w mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej [Demishtein-Zohary i wsp. 2017].

Dotychczas wykazano udział kilku szlaków sygnałowych w biogenezie mitochondriów:

1) szlak AMPK/ PGC-1 α z udziałem C1q/białko związane z czynnikiem martwicy nowotworu-3) (ang. *tumour necrosis factor-related protein-3/C1q*) aby promować biogenezę w kardiomiocytach [Zhang i wsp. 2017] i w komórkach HepG2 [Deng i wsp. 2019].

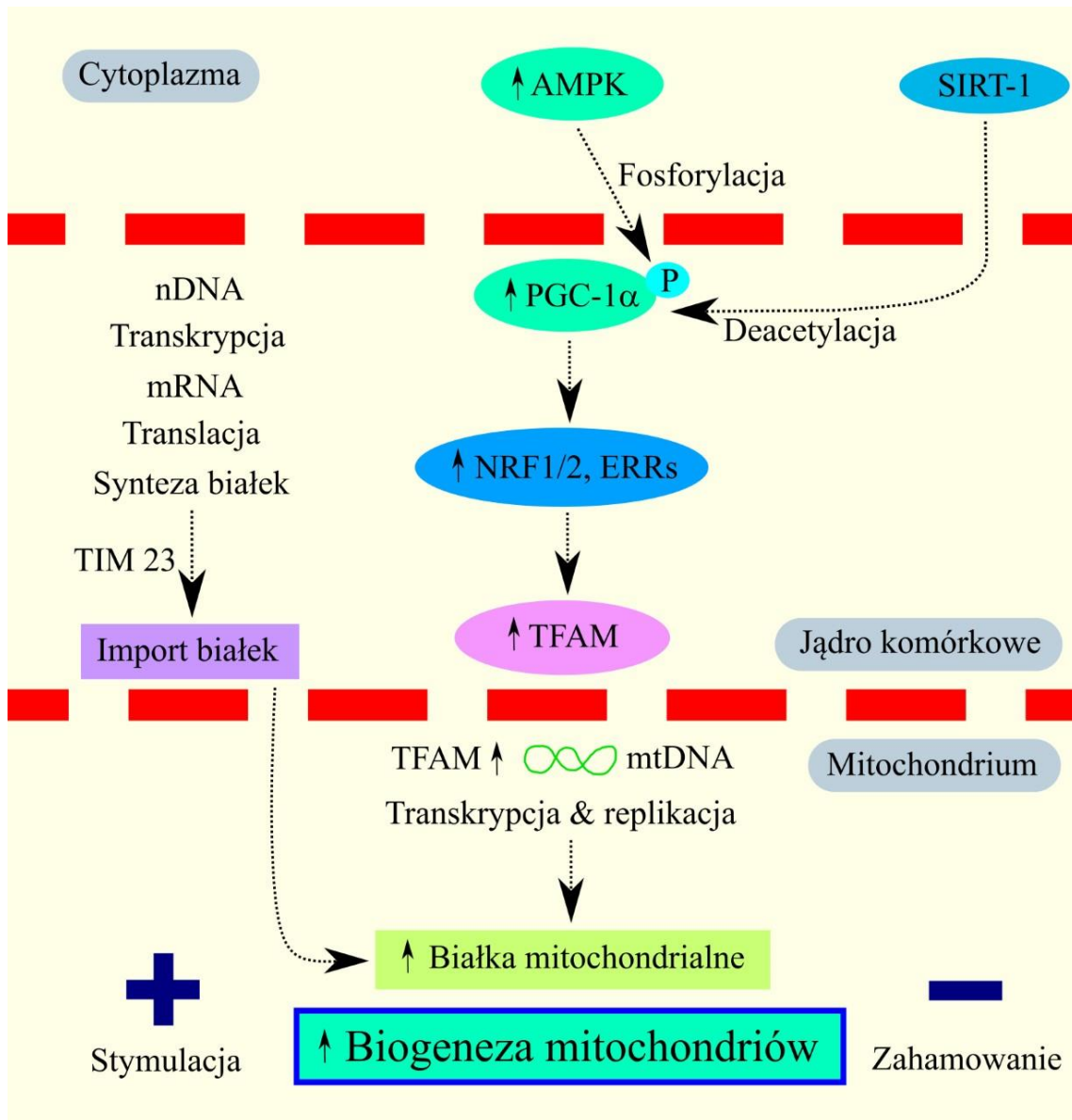
Ponadto, AMPK fosforyluje i aktywuje acetylotransferazę histonową 1 (HAT1), tworząc luźną strukturę chromatyna-DNA, która promuje transkrypcję; AMPK fosforyluje także czynnik epigenetyczny DNA metylotransferazy 1 (DNMT1), który ogranicza dostęp czynników transkrypcyjnych do promotora [Marin i wsp. 2017].

2) indukcja PGC-1 α wraz z jego dalszymi genami docelowymi *NRF1* and *TFAM*. Taką kaskadę sygnalizacyjną zidentyfikowano dla komórek trzustki MIN6 β -cells, po potraktowaniu humaniną [Qin i wsp. 2018] i 3T3-L1 pre-adipocytów po potraktowaniu salicylanem [Yan i wsp. 2017]. Aktywacja szlaku sygnałowego PGC-1 α może być również pośredniczona poprzez białko wiążące z elementem odpowiedzi na cAMP (CREB) ang. *cAMP response element-binding protein* (CREB); który wiąże się ze szczególną sekwencją w DNA (z elementem odpowiedzi na cAMP) i następnie zwiększa/obniża transkrypcję genów. W komórkach endotelialnych szlak CREB/ PGC-1 α promuje mitochondrialną biogenezę przez aktywację G protein-coupled receptor (TGR5) [Zhao i wsp. 2018] .

3) szlak G $\beta\gamma$ -Akt-eNOS-sGC - stymulacja białka G (komponenty G $\beta\gamma$) i Akt-eNOS-sGC (ang. *soluble guanylate cyclase*) przez agonistów receptorów β 2 adrenergicznych, jak formoterol, pozwala na regenerację w ostrych i podostrych chorobach degeneracyjnych [Cameron i wsp. 2017] i carvedilol stosowany w chorobach serca [Yao i wsp. 2016].

4) oś Akt/ transcription factor FoxO3a pod wpływem pochodzącego z diety β -hydroksy- β -metylomaślan (HMB) [Duan i wsp. 2019].

5) sirtuina (ang. *silent information regulator-1*) (SIRT1) - aktywuje pośredniczoną przez PGC-1 α transkrypcję genów mitochondrialnych i jądrowych kodujących białka dla mitochondrialnej fosforylacji oksydacyjnej i produkcji energii. SIRT3 stymuluje białka istotne dla fosforylacji oksydacyjnej, cyklu kwasów trójkarboksylowych, oksydacji kwasów tłuszczowych i pośrednio także PGC-1 α i AMPK [Duan i wsp. 2019], (Ryc.5).



Rycina 5. Biogeneza mitochondriów.

Aktywacja PGC-1 α pełni nadrzędną rolę w zwiększeniu ekspresji białek mitochondrialnych. (AMPK) Kinaza aktywowana AMP ang. *adenosine monophosphate activated protein kinase*; (ERR) Receptor związany z estrogenem, ang. *estrogen-related receptor*; (NRF) jądrowy czynnik oddechowy, ang. *nuclear respiratory factor*; (PGC-1 α) koaktywator 1 α receptora γ aktywowany przez proliferatory peroksysomów, ang. *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α* ; (SIRT-1) ang. *silent information regulator-1*; (TFAM) czynnik transkrypcyjny α , ang. *transcription factor α* ; (TIM 23) translokaza TIM23, ang. *translocase TIM23*.

2.7 Rola dynamiki mitochondrialnej w komórkach mięśni

Nieliczne badania kardiomiocytów pochodzących od pacjentów z niewydolnością serca dostarczyły pewnych dowodów na zwiększoną fragmentację mitochondriów, która była skorelowana ze zmniejszoną ekspresją białka Opa1 [Chen i wsp. 2009]. Niektóre badania

sugerują również, że zaburzenia dynamiki mitochondriów w mięśniach szkieletowych mogą przyczyniać się do insulinooporności [Jheng i wsp. 2012, Quirós i wsp. 2012].

Przypuszcza się, że nadmiar kalorii sprzyja fragmentacji mitochondriów poprzez nie poznany dotychczas mechanizm. Wykazano, że jeśli stan nadmiernej podaży kalorii przedłuża się, nasila to nadprodukcję ROS i upośledza sygnalizację insulinową. Co więcej, ten patologiczny stan może się pogłębić w wyniku mutacji lub zmienionej ekspresji białek, co będzie osłabiać lub sprzyjać fragmentacji mitochondriów. Wykazano, że insulinooporność jest związana z dysfunkcją mitochondriów, charakteryzującą się zmniejszoną biogenezą mitochondriów i zmniejszoną odpowiedzią bioenergetyczną na stymulację insuliną. Mechanizmy obejmują represję transkrypcji genów mitochondrialnych, lipotoksyczność i bezpośrednie skutki jakie wywołuje insulinooporność [Pagel-Langenickel 2010]. Nie wiadomo jednak dotychczas, czy dysfunkcja mitochondriów mięśni szkieletowych jest przyczyną, czy konsekwencją insulinooporności. Wydaje się prawdopodobnym, że dysfunkcja mitochondriów może prowadzić do nadprodukcji ROS, niepełnego utleniania kwasów tłuszczowych i zmniejszenia wydatku energetycznego, co może nasilać insulinooporność [Pagel-Langenickel 2010].

Wykazano, że w mięśniach szkieletowych dysfunkcja mitochondriów może wystąpić również bez insulinooporności, co więcej, wykazano także oporność na insulinę przy braku dysfunkcji mitochondriów. Przeprowadzono dotychczas niewiele badań dotyczących zmian ekspresji białek związanych z dynamiką mitochondriów na modelach zwierzęcych i ludziach z otyłością i insulinoopornością. Większość badań koncentrowała się na białku Mfn2 i ujawniła obniżone poziomy mRNA i białka Mfn2 w mięśniach szkieletowych ang. *zucker fatty rats* oraz u ludzi z cukrzycą typu 2. Stwierdzono, że obniżony poziom Mfn2 korelował z insulinoopornością mięśni szkieletowych, a za represję transkrypcji białka Mfn2 odpowiedzialny może być obniżony poziom PGC-1 α , [Pulliam i wsp. 2013, Zorzano 2010a, Zorzano 2010b].

Na podstawie badań z zastosowaniem różnych mysich modeli z ukierunkowanymi mutacjami białek regulatorowych dynamiki mitochondriów w mięśniu sercowym lub szkieletowym, wykazano, że zakłócenie fuzji lub fragmentacji mitochondriów zaburza homeostazę mitochondrialną i komórkową [Dorn i wsp. 2013]. W sercu zaburzenie fuzji mitochondrialnej przez wyłączenie genów (knockout) mitofuzyn Mfn 1 i Mfn 2 prowadzi do przebudowy mięśnia sercowego i wczesnej śmierci, podczas gdy utrata Drp1 prowadzi do rozwinięcia niewydolności serca [Song i wsp. 2017]. Co ciekawe, gdy zarówno fuzja jak i fragmentacja mitochondriów zostały zahamowane w sercu, zwierzęta przeżywały dłużej niż te

z upośledzeniem jednego z procesów, jednakże przejawiały fenotyp przyspieszonego starzenia mięśnia sercowego związanego z zaburzeniem funkcji mitochondriów [Song i wsp. 2017].

Wykazano, że wyciszenie genu *Mfn 2* w mięśniach szkieletowych, w mięśniu sercowym i wątrobie istotnie zaburza homeostazę metaboliczną i skutkuje insulinoopornością, przy nieistotnym wpływie na masę ciała. Zaobserwowano również istotne zmiany w ekspresji białek łańcucha oddechowego i szybkości fosforylacji oksydacyjnej, jednakże synteza ATP była prawidłowa pomimo zwiększonego stężenia ROS [Song i wsp. 2017]. Zatem utrata białka *Mfn2* w mięśniach szkieletowych może nasilać stres oksydacyjny silniej niż wpływać na upośledzenie statusu energetycznego mitochondriów. Badania *in vitro* sugerują również, że przeładowanie lipidami nasila fragmentację mitochondriów, w której pośredniczy białko *Drp1*, częściowo w odpowiedzi na stres oksydacyjny, co dodatkowo nasila insulinooporność [Song i wsp. 2017]. Wykazano, że ekspresja proteazy ang. *presenilin associated rhomboid like* (PARL) jest obniżona u otyłych zwierząt i ludzi z cukrzycą typu 2. Chociaż początkowo odkryto ją jako proteazę *Opal*, to obecnie wiadomo, że PARL reguluje strukturę i funkcje mitochondriów w złożony sposób, w tym jest regulatorem transkrypcji wpływającym na ekspresję genów *Opal* i *Mfn2*. Zaobserwowano, że wyciszenie PARL za pośrednictwem siRNA w mięśniach szkieletowych myszy lub w hodowlach ludzkich miotubuli hamowało ekspresję *Opal* i *Mfn2*, zmniejszało integralność grzebieni mitochondrialnych i wywoływało stres oksydacyjny, insulinooporność i akumulację lipidów [Civitarese i wsp. 2010].

Obniżoną ekspresję białek PARL, *Opal* i *Mfn2* opisano u ludzi z insulinoopornością (osoby starsze, pacjenci z cukrzycą typu 2) i u otyłych naczelnych [Liesa i wsp. 2009]. Wykazano ponadto, że niedobór PARL w linii germinacyjnej prowadzi do przedwczesnej śmierci z powodu kacheksji [Cipolat i wsp. 2006]. Biorąc pod uwagę wielokierunkowość działania białka PARL przydatność modeli komórkowych i zwierzęcych o obniżonej ekspresji lub z wyciszonym genem do oceny udziału *Opal* w regulację odpowiedzi na insulinę w bioenergetyce mitochondriów jest ograniczona. Wykazano jednakże, że delekcja białka *Opal*, proteazy *Opal*, ujawnia złożony fenotyp metaboliczny charakteryzujący się otyłością, hiperleptynemią i stłuszczeniem wątroby po karmieniu wysokotłuszczowym, ale bez rozwinięcia insulinooporności [Quirós i wsp. 2012]. Wyniki tych badań podkreślają złożone interakcje między dynamiką mitochondriów, homeostazą metaboliczną i insulinoopornością, ale nadal nie dają odpowiedzi na pytanie o rolę białka *Opal* w metabolizmie tkanki mięśniowej. Dotychczas wykazano, że insulina nasila metabolizm mitochondriów w mięśniu

sercowym i szkieletowym, skutkiem zwiększenia fuzji mitochondrialnej i podwyższoną ekspresją Opa1 zarówno w badaniach *in vivo* i *in vitro* [Cipolat i wsp. 2006, Parra i wsp. 2014]. Wyciszenie Opa1 w hodowlach komórek mięśniowych wpłynęło na zahamowanie zdolności insuliny do zwiększenia metabolizmu mitochondriów [Cipolat i wsp. 2006, Parra i wsp. 2014]. Obecnie nie wiadomo, czy wzrost metabolizmu mitochondriów, w którym pośredniczy Opa1, jest bezpośrednią konsekwencją zwiększonej fuzji mitochondrialnej, zwiększonej gęstości grzebieni mitochondrialnych, czy obu tych zjawisk [Cipolat i wsp. 2006, Parra i wsp. 2014]. Badania mitochondriów ze zmniejszoną ekspresją Opa1 w mięśniach szkieletowych ujawniło upośledzoną morfologię grzebieni mitochondrialnych i obniżoną bioenergetykę mitochondrialną. Jednak myszy z indukowanym obniżeniem ekspresji Opa1 (smOpa1^{-/-}) w mięśniach szkieletowych nie wykazywały oporności na insulinę [Pereira i wsp. 2017]. Myszy nie rozwinęły też związanej z wiekiem otyłości ani insulinooporności. Zastosowanie diety wysokotłuszczowej u tych myszy nie spowodowało rozwinięcia się u nich otyłości ani cukrzycy, ponadto wykazano istotną redukcję masy tłuszczowej, która odpowiadała za brak otyłości. Indukowanie niedoboru Opa1 w mięśniach szkieletowych u myszy po karmieniu wysokotłuszczowym, wywoływało natomiast wywoływało otyłość i cukrzycę typu 2. Obniżenie ekspresji Opa1 w mięśniach szkieletowych myszy otyłych i myszy z cukrzycą doprowadziło do istotnego zmniejszenia otyłości i cukrzycy [Pereira i wsp. 2017]. Obserwacje te doprowadziły do hipotezy, że mięśnie szkieletowe z niedoborem Opa1 wydzielają czynnik wpływający na ogólnoustrojową homeostazę metaboliczną, czynnik wzrostu fibroblastów 21 (FGF21), którego stężenie w mięśniach badanych myszy było zwiększone. W warunkach fizjologicznych FGF21 jest białkiem pochodzącym z wątroby, który może być również uwalniany z tkanki tłuszczowej. U ssaków wykazuje wielostronne działanie, które obejmuje zwiększenie wydatku energetycznego, poprawę homeostazy glukozy, redukcję lipidów i zmniejszenie preferencji smakowej dla cukru [Markan i wsp. 2016].

Aby zrozumieć mechanizm łączący niedobór Opa1 w mięśniach szkieletowych z indukcją ekspresji genu *FGF21* badacze wykorzystali myszy, u których geny *FGF21* i *Opa1* zostały jednocześnie wyciszone w mięśniach szkieletowych [Pereira i wsp. 2017]. Zmniejszona ekspresja Opa1 w mięśniach szkieletowych myszy doprowadziła do aktywacji odpowiedzi ang. *ER stress pathway*. Aktywacja tego szlaku, służy przede wszystkim do maksymalizacji zdolności retikulum endoplazmatycznego do utrzymania fałdowania białek w warunkach zwiększonej syntezy białek. Aktywacja tego szlaku prowadzi do wytworzenia

regulatorów transkrypcji, takich jak XBP1 i ATF4, które mogą wiązać promotor genu FGF21. Niedawne badania u ludzi z miopatią mitochondrialną ujawniły podwyższone poziomy FGF21 we krwi. Zatem pogląd, że mięśnie szkieletowe można wskazać jako potencjalne endogenne źródło FGF21, jest prawdopodobny, ale musi zostać poparty dalszymi badaniami [Lehtonen i wsp. 2016].

Aby ocenić konsekwencje zwiększonego zużycia kwasów tłuszczowych w mięśniu sercowym na dynamikę mitochondriów, zbadano myszy z nadekspresją syntetazy acylo-CoA, (co powodowało dwukrotnie większe zużycie kwasów) [Tsushima i wsp. 2018]. Obserwowany wzrost wychwytu kwasów tłuszczowych przez mięsień sercowy wywoływał zmiany w sieci mitochondrialnej. U młodych myszy mitochondria mają niewielką średnicę, w trakcie rozwoju następuje stopniowy wzrost szerokości mitochondriów, który jest związany z hamowaniem Drp1 (o czym świadczy zwiększona fosforylacja białka Drp1 w Ser 637). Z kolei u myszy z nadekspresją syntetazy acylo-CoA nie zaobserwowano takiej zmiany w morfologii mitochondriów, natomiast stwierdzono obniżoną fosforylację białka Drp1 na Ser 637. Obniżenie fosforylacji Drp1 jest związane ze zwiększoną aktywnością białka, która nasila fragmentację mitochondriów i zmniejsza ich fuzję. Obniżenie aktywności Drp1 w modelu przeciążenia lipidami, spowodowało, że fragmentacja sieci mitochondrialnej była osłabiona. Białko kotwiczące mitochondrialnej kinazy białkowej A (PKA) - białko 121 (AKAP121) jest białkiem szkieletowym, które ułatwia interakcję PKA z substratami, takimi jak Drp1. U myszy wykazano niższą ekspresję AKAP121 i nasilenie jego degradacji w proteasomach. Oprócz potranslacyjnych modyfikacji Drp1, przeciążenie lipidami zaburzyło również proteolityczne rozszczepienie Opa1, prowadząc do zwiększenia ekspresji nieaktywnej izoformy [Tsushima i wsp. 2018]. Badania te ujawniają, że nadmiar lipidów modyfikuje szlaki sygnałowe, które regulują dynamikę mitochondriów w sercu.

Wykazano, że zmiany dynamiki mitochondriów mięśniowych mogą być wywołane przez modyfikacje białek sygnałowych wywołane stresem oksydacyjnym i nadprodukcją ROS. U myszy z nadekspresją syntetazy acylo-CoA i nadekspresją mitochondrialnej formy dysmutazy ponadtlenkowej (SOD 2), fragmentacja sieci mitochondrialnej była zmniejszona [Tsushima i wsp. 2018]. Wyniki tych badań wskazują, że wielkość mitochondriów w mięśniu sercowym jest dynamicznie regulowana przez stan redox co podkreśla pogląd, że mitochondria to dynamiczne organelle, które dostosowują swój rozmiar i kształt nawet w dojrzałych, ale metabolicznie aktywnych tkankach, takich jak mięsień sercowy.

Podsumowując, mitochondria to dynamiczne organelle, które zmieniają swoją morfologię w odpowiedzi na bodźce środowiskowe. Istnieje ścisły związek między fizjologicznymi zmianami w wielkości sieci mitochondrialnej a funkcją metaboliczną mitochondriów. Zmiany w strukturze i funkcji mitochondriów modulują komunikację między organellami, prowadząc do modyfikacji szlaków sygnałowych w komórkach mięśniowych, co ma istotne konsekwencje dla ogólnoustrojowej homeostazy metabolicznej. Dlatego mitochondria w tkankach metabolicznie aktywnych, takich jak mięśnie, nie powinny już być postrzegane jako statyczne organelle, które jedynie wytwarzają ATP, ale raczej jako dynamiczne struktury, których forma i kształt determinuje ich funkcję.

2.8. Uniwersalne znaczenie metabolizmu puryn

Nukleotydy purynowe biorą udział we wszystkich procesach metabolicznych zachodzących w komórkach: (1) ATP jest nośnikiem energii, łączy procesy w których energia jest zużywana, z procesami w których jest wytwarzana (2) są prekursorami kwasów nukleinowych (3) regulatorami kluczowych procesów metabolicznych (4) substratami w biosyntezie cząsteczek sygnałowych jak - cykliczne nukleotydy (5) neuroprzekaznikami w układzie nerwowym - jak adenozyna i ATP (6) prekursorami koenzymów - jak FAD, CoA, NAD, NADP (7) efektorami allosterycznymi - jak stężenie ATP/AMP, kontrolujące wiele szlaków metabolicznych (8) aktywnymi związkami pośrednimi w wielu biosyntezach - jak S-adenozynometionina [Burnstock 2020].

2.9. Nukleotydy adenylanynowe a metabolizm energetyczny komórek

Najważniejszym wskaźnikiem umożliwiającym analizę stanu energetycznego komórek jest ładunek energetyczny adenylanów (AEC) ang. *Adenylate Energy Charge*. Energia puli adenylanów definiowana jest jako $AEC = (ATP + 0,5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$. Wartości jakie może przyjmować AEC mieszczą się w zakresie od 0 (kiedy całą pulę nukleotydów stanowi AMP) do 1, wówczas wszystkie nukleotydy adenylowe występują w formie ATP. W warunkach homeostazy organizmu AEC podlega ścisłej kontroli i ma wartość 0,8-0,9. AEC zbliżony do 1 świadczy o wysokim potencjale energii metabolicznej. Wartości 0,55-0,75 mogą wskazywać na negatywne działanie czynnika stresowego, indukującego wydatkowanie energii w kierunku mechanizmów obronnych, a wartości poniżej 0,5 towarzyszą śmierci komórki [Burnstock 2020].

3. HIPOTEZY BADAWCZE i CEL PRACY

Ekspozycja na niskie temperatury może być rozpatrywana jako czynnik stresogenny, który, jak sugerują doniesienia naukowe, w przypadku powtarzającego się działania może prowadzić do reakcji adaptacyjnych. Można zatem przypuszczać, że zimno stosowane ogólnoustrojowo, po uwzględnieniu przeciwwskazań, indywidualnego dostosowania temperatury, czasu trwania, formy ekspozycji oraz płci może być czynnikiem pozytywnie modyfikującym proces starzenia się mięśni, poprzez usprawnienie mechanizmów związanych z biogenezą mitochondriów i syntezą ATP.

Biorąc powyższe pod uwagę postawiono **hipotezę** o możliwości pozytywnego wpływu wysiłku fizycznego w zimnej wodzie na biogenezę mitochondriów i metabolizm energetyczny mięśni starzejących się szczurów.

Celem pracy była (1) ocena wpływu aktywności fizycznej w zimnej wodzie na parametry stanu energetycznego, zawartość związków purynowych i biogenezę mitochondriów w mięśniach starzejących się szczurów (2) ocena zmian stężenia związków wysokoenergetycznych i zmian ekspresji białek regulujących dynamikę mitochondriów w mięśniach jako wskaźników wpływu wysiłku fizycznego w zimnej wodzie i ich przydatności w monitorowaniu zmian adaptacyjnych.

Cele szczegółowe obejmowały: oznaczenie stężenia ATP (adenozyno-5'-trifosforanu); ADP (adenozyno-5'-difosforanu); AMP (adenozyno-5'-monofosforanu); Ado (adenozyny); wartości potencjału energetycznego adenylanów (AEC); wartości puli nukleotydów adenylowych (TAN) oraz ekspresji mRNA i białka koaktywatora 1 α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PGC-1 α); ekspresji mRNA mitofuzyny 1 (Mfn1); mitofuzyny 2 (Mfn2); ekspresji mRNA Opa1; ekspresji mRNA Drp1 w mięśniach szkieletowych starzejących się szczurów poddanych treningowi fizycznemu w zimnej wodzie.

4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania zostały przeprowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Szczecinie (Uchwała nr: 4/2014). Zwierzęta były hodowane w zwierzętarni Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM). Badania prowadzono w Katedrze i Zakładzie Diagnostyki Funkcjonalnej i Medycyny Fizykalnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie w latach 2013 – 2023, w oparciu o kontynuację wcześniejszego projektu pt: "*Zmiany adaptacyjne w organizmie szczurów eksponowanych na niskie temperatury*", finansowanego ze środków Funduszu Stymulacji Nauki PUM (FSN-318-09/13). Do celów realizacji niniejszej pracy doktorskiej udostępniono materiał biologiczny w postaci tkanki mięśniowej pobranej w trakcie realizacji w.w. projektu i zabezpieczonego do czasu wykonywania analiz.

4.1. Model badań

Badania przeprowadzono na 64 osobnikach szczurów obu płci stada niekrewniaczego Wistar (32 samców i 32 samic) będących w chwili rozpoczęcia doświadczenia w wieku 15 miesięcy. Zwierzęta przed rozpoczęciem badań zostały poddane miesięcznej kwarantannie w zwierzętarni PUM. Przez cały okres trwania kwarantanny oraz w czasie prowadzonych doświadczeń szczury były żywione paszą standardową LSM (granulowana mieszanka dla myszy i szczurów) oraz otrzymywały wodę wodociągową do picia *ad libitum*.

Szczury losowo przydzielono do grup badawczych:

Grupy kontrolne (n = 16 osobników); zwierzęta przebywające w warunkach sedenteryjnych

Grupa kontrolna samce (n = 8)

Grupa kontrolna samice (n = 8)

Grupy badane 5°C (n = 24 osobniki); zwierzęta poddane aktywności fizycznej w zimnej wodzie o temperaturze $5 \pm 2^\circ\text{C}$

Grupa 5°C samce (n = 12)

Grupa 5°C samice (n = 12)

Grupy badane 36°C (n = 24 osobniki); zwierzęta poddane aktywności fizycznej w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego ($36 \pm 2^\circ\text{C}$)

Grupa 36°C samce (n = 12)

Grupa 36°C samice (n = 12)

Wszystkie zwierzęta przebywały w zwierzętarni w specjalistycznych plastikowych klatkach o ażurowej pokrywie, mając do dyspozycji ściółkę z zestalonego mialu drewnianego. W

zwierzetarni panowały stałe warunki temperaturowe ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), stała wilgotność powietrza (ok. 40%) oraz 12-godzinny cykl dnia i nocy. Zwierzeta przebywały po cztery osobniki jednakowej płci w pojedynczej klatce, mając swobodny dostęp do suchej karmy i wody.

4.2. Procedura doświadczalna

Czas trwania doświadczenia, związany z codzienną aktywnością fizyczną zwierząt w wodzie wynosił 9 tygodni. Przed rozpoczęciem serii przewidzianych w badaniach imersji w wodzie, każdy osobnik z grup badanych był umieszczany na 2 minuty w pustym szklanym zbiorniku (o wymiarach: długość 100 cm, szerokość 50 cm, głębokość 50 cm). Takie postępowanie miało na celu przyzwyczajenie szczurów do kontaktu z prowadzącym doświadczenie i warunków otoczenia doświadczalnego. Czynność tę powtarzano przez 7 dni poprzedzających rozpoczęcie doświadczenia.

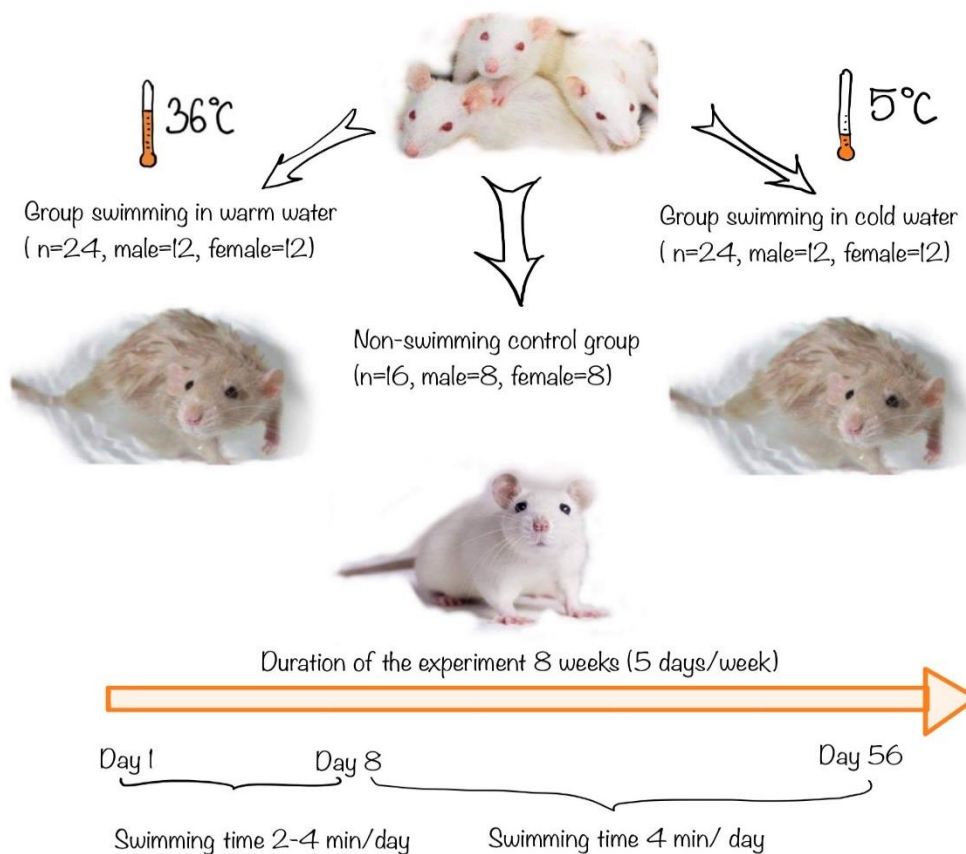
Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszej imersji w wodzie wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany każdego następnego dnia o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu aktywności fizycznej w wodzie wynoszącej 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Czas pojedynczego treningu wyznaczono na podstawie wyników innych badaczy, które dowodzą, że w wodzie o temperaturze $4\text{-}5^{\circ}\text{C}$ szczury aktywnie pływają maksymalnie do 4 minut, a następnie biernie dryfują [Teległów 2012]. Na podstawie danych literaturowych wiadomo również, że szczury pływające w temperaturze komfortu cieplnego mogą pozostawać aktywne znacznie dłużej [Teległów 2012]. Z uwagi na potrzebę ujednoczenia zakresu aktywności fizycznej dla wszystkich zwierząt z grup badanych, niezależnie od temperatury środowiska wodnego, zastosowano 4 minutowe codzienne sesje pływackie dla każdej z grup. W ten sposób czynnikiem zmiennym oddziałującym na zwierzęta pozostała wyłącznie temperatura wodny w której pływały zwierzęta.

W konsekwencji od początku drugiego do końca ósmego tygodnia czas sesji pływackich zwierząt wynosił 4 minuty dziennie. Treningi prowadzono codziennie przez 5 dni w tygodniu (z wyjątkiem sobót i niedziel) w godzinach porannych, każdorazowo kończących się do godziny 12,00. W zbiorniku pływał jednocześnie zawsze tylko jeden osobnik. Każdy szczur po zakończeniu ćwiczeń pływackich był starannie osuszony przy pomocy papierowego ręcznika oraz przez kilka minut pozostawał zawinięty w suchej ligninie, w osobnej klatce, aby zapobiec ewentualnemu wyziębieniu. Następnie szczury były umieszczane w swoich

macierzystych klatkach. Szczury z grup kontrolnych były również codziennie oswajane z dotykiem oraz umieszczane w pustym szklanym suchym zbiorniku na czas 4 minut.

W trakcie trwania badań zanotowano śmierć jednego osobnika z grupy kontrolnej oraz 3 zwierząt z grup badanych z przyczyn nie związanych bezpośrednio z doświadczeniem.

Rycina 6 przedstawia schemat przeprowadzonych procedur.



Rycina 6. Schematyczne przedstawienie procedur badawczych zastosowanych w eksperymencie.

Po zakończeniu badań, czterdzieści osiem godzin po ostatniej sesji pływackiej przeprowadzono sekcje zwierząt w anestezji chlorowodorkiem ketaminy, podanym domięśniowo w dawce 10 mg/kg masy ciała.

4.3. Przygotowanie materiału do badań

Tkankę mięśni szkieletowych uda szczurów pobrano w trakcie wykonywania sekcji zwierząt i natychmiast umieszczano w ciekłym azocie. Próby następnie przechowano w temperaturze -80°C do czasu wykonania dalszych oznaczeń stężenia ATP, ADP, AMP, Ado oraz ekspresji białka PGC-1 α , ekspresji mRNA PGC-1 α , Mfn1, Mfn2, Opa1, Drp1.

4.4. Oznaczanie stężenia ATP, ADP, AMP, Ado metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Analizę stężenia ATP, ADP, AMP, Ado w mięśniach przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high performance liquid chromatography* - HPLC) [Smolenski i wsp. 1990]. Zamrożoną w ciekłym azocie tkankę mięśniową umieszczono w termoboksie (-21°C). Następnie mały fragment tkanki przeniesiono do metalowego homogenizatora, który został wcześniej schłodzony w pojemniku z płynnym azotem i zalano się 2-3 krotnie ciekłym azotem. Pobraną tkankę zhomogenizowano poprzez kilkukrotne uderzenie młotkiem (4-5 razy) w metalowy trzpień homogenizatora (również wcześniej schłodzony w pojemniku z ciekłym azotem). Sproszkowaną i zamrożoną tkankę mięśniową (ok. 1 mg białka) schłodzoną w ciekłym azocie łyżeczką przeniesiono do probówki Eppendorf zawierającej 500 μl 1,3 M kwasu nadchlorowego (wcześniej schłodzonego do temp. 4°C). Po krótkim wymieszaniu (vortex) przeprowadzono dalszą homogenizację za pomocą homogenizatora nożowego przez około 15 sekund. Homogenat został następnie odwirowany (16000 \times G przez 10 min, w 4°C). Supernatant (600 μl) zobojętniono przez dodanie około 60-90 μL 3 M roztworu ortofosforanu potasu (pH 6,0-7,0). Zneutralizowany supernatant odwirowano (16000 \times G przez 10 min, w 4°C), otrzymany przesącz był przechowywany w -80°C do dalszej analizy. W przygotowanych według powyższej procedury próbach oznaczono stężenie pochodnych purynowych. Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu chromatograficznego Hewlett Packard Series 1100. Do analizy HPLC zostały użyte odczynniki: acetonitryl - (gradient grade) firmy Merck, KCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 (micro select) firmy Fluka. Wzorce analizowanych puryn pochodziły z firmy Sigma, wodę uzyskano z systemu Milli- Q (Millipore). System chromatograficzny Hewlett Packard Series 1100 składał się z poczwórnej pompy gradientowej z mieszalnikiem niskociśnieniowym, detektora UV VWD (Variable Wavelength Detector), ręcznego zaworu dozującego Rheodyne 7725i z pętlą o objętości 20 μl , próżniowego układu odgazowania buforów, przedziału termostatowania kolumny HP G 1316A. Oznaczenia zostały wykonane

na kolumnie 100 mm × 4,6 mm, wypełnionej przez producenta (Hewlett Packard) materiałem Hypersil BDS-C 18, o średnicy ziaren 3 μm. Dane chromatograficzne zostały przygotowane za pomocą oprogramowania HP Chemstation (Hewlett Packard). Do chromatografii zastosowano: (Bufor A) stanowił 150 mM bufor fosforanowy KH₂PO₄ / K₂HPO₄ zawierający 150 mM KCl o pH 6. (Bufor B) stanowił 15% roztwór acetonitrylu w buforze A. Przed użyciem bufory zostały przefiltrowane (zastosowano filtry nylonowe o porach średnicy 0,22 μm oraz system filtracyjny firmy Supelco). Niskociśnieniowy mieszalnik gradientowy kontrolował skład faz ruchomych. Zawartość buforu B była zmieniana w czasie: 0 min - 0 % B; 0,1 min - 2% B; 3,5 min - 7% B; 6,75 min - 35% B; 7,20 min - 50% B; 7,65 min - 100% B; 8,55 min - 100% B; 8,65 min - 0% B. Dla cyklu 12,8 min. między kolejnym podaniem prób do zaworu dozującego czas reekwilibracji wynosił 4,9 min. Prędkość przepływu rozpuszczalników przez kolumnę wynosiła: 0,666 ml/min. Kolumna była termostatowana w temperaturze 20,5 °C. Utrzymanie stałych warunków poprzez termostatowanie przedziału kolumny chromatograficznej gwarantowało, że czasy retencji oznaczanych związków zmieniały się w bardzo wąskim zakresie ± 0,05 min. Długość fali detektora wynosiła: 254 nm.

4.5 Analiza ekspresji genów *PGC1A*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*, *Drp1* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (qRT PCR)

Ilościowej oceny ekspresji genów *PGC1A*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*, *Drp1* kodujących odpowiednio białka: mitofuzynę 1 (Mfn1), mitofuzynę 2 (Mfn2), białko ang. *optic atrophy 1* (Opa1), białko związane z dynaminą 1 (ang. *dynammin-related protein 1*) w mięśniach dokonano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time polymerase chain reaction qRT PCR*). Z tkanek przechowywanych w temperaturze -80 °C wyizolowano RNA z wykorzystaniem komercyjnego zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Niemcy). Ilość i jakość wyizolowanego RNA zbadano za pomocą spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA). Matryca została przepisana na cDNA z wykorzystaniem 1 μg RNA w 20 μl całkowitej objętości próbki z użyciem Omniscript RT Kit (Qiagen, Germany) według instrukcji producenta. qRT-PCR został przeprowadzony przy użyciu urządzenia 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) oraz odczynnika Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), który jest roztworem buforu zawierającym polimerazę DNA AmpliTaq Gold, mieszaninę deoksynukleotydów, barwnik SYBR Green oraz barwnik referencyjny ROX (normalizacja sygnału fluorescencji). Monitorowanie

przyrostu produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono dzięki pomiarowi fluorescencji, który jest proporcjonalny do stężenia produktu w mieszaninie. Każdą próbkę przeanalizowano dwukrotnie, a wyniki stanowiły średnią z dwóch pomiarów. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 12,5 µl odczynnika Power SYBR Green PCR Master Mix, startery forward i reverse dla badanego genu w końcowym stężeniu 0,5 µM oraz 50 ng cDNA. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 µl. W reakcji zastosowane zostały warunki: 95 °C (15 s), 40 cykli w 95 °C (15 s) i 60 °C (1 min). Poziom ekspresji genu białka PGC w każdej próbce został porównywany z kontrolą endogenną. Specyficzność reakcji została oceniona przy użyciu analizy krzywych topnienia, które potwierdziły amplifikację tylko jednego produktu reakcji PCR. W badaniach wykorzystano startery dla badanych genów:

nazwa: rMfn1_F
sekwencja: ATGGCAGAAACGGTATCTCCA
nazwa: rMfn1_R
sekwencja: GCCCTCAGTAACAAACTCCAGT
nazwa: rMfn2_F
sekwencja: AGAACTGGACCCAGTTACTA
nazwa: rMfn2_R
sekwencja: CACCTCGCTGATTCCCCTGA
nazwa: rOpal1_F
sekwencja: CCGTGTGAGCAGAAGAACAC
nazwa: rOpal1_R
sekwencja: AGCCTCAAGGCCAACTATGT
nazwa: rDrp1_F
sekwencja: CAGGAACTGTTACGGTTCCTAA
nazwa: rDrp1_R
nazwa: Pparg1a_F
sekwencja: TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT
nazwa: Pparg1a_R
sekwencja: GTCACTACACCACTTCAATCC

Kontrolę stanowił gen referencyjny – *GAPDH*. Ekspresja względna genu *PGC1A* wyznaczona została metodą komparatywną $\Delta\Delta C_t$, według wzoru $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, gdzie ΔC_t dla kalibratora = (Ct kalibratora badanego genu) - (Ct genu referencyjnego), ΔC_t dla nieznannej próby = (Ct badanego genu) - (Ct genu referencyjnego), a $\Delta\Delta C_t$ = (ΔC_t próbki badanego genu) - (ΔC_t kalibratora badanego genu), gdzie Ct oznacza cykl progowy.

4.6. Analiza ekspresji białka PGC-1 α metodą Western blot

Analizę ekspresji białka PGC-1 α - kluczowego enzymu zaangażowanego w biogenezę mitochondriów wykonano metodą Western blot.

Przygotowanie materiału do badań

Z wyizolowanej tkanki mięśniowej sporządzano 2,5% homogenat w buforze 2xSB – Sample Buffer. Uzyskane homogenaty umieszczano na 5 min w termobloku w temperaturze 95°C, a następnie po schłodzeniu, próbki nakładano na żel lub przechowywano w –20 °C.

Do przygotowania Sample Buffer wykorzystano: bufor 625 mM Tris-HCl pH = 6,8; 20% glicerol, 2% dodecylo-siarczan sodu (SDS), ditiotreitoleil (DTT) 100 mM, błękit bromofenolu 0,2 mM.

Elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym

Proces elektroforezy opiera się na wędrówce molekuł w żelu poliakrylamidowym zgodnie z wytworzonym zewnętrznym polem elektrycznym. Poliakrylamid jest obojętnym chemicznie podłożem o porowatej strukturze. Powstaje on przez polimeryzację akrylamidu i bisakrylamidu. Wytworzenie pola elektrycznego skutkuje wędrówką ujemnie naładowanych cząsteczek w kierunku anody: łatwiej wnikając w kanaliki żelu cząsteczki o niskiej masie wędrują dalej, natomiast cząsteczki o wyższej masie wędrują w żelu wolniej. W zależności od stężenia żelu szybkość penetracji cząsteczek jest różna, stąd stosuje się 2 żele: zagęszczający 4% – górny, wyrównujący nakładane próbki oraz dolny, którego stężenie zależne jest wielkości badanego białka. Preinkubacja z SDS oraz ditiotreitolem powoduje denaturację białka, a następnie wędrówka cząstek w żelu skutkuje ich rozdzieleniem według wielkości. Detergent anionowy – SDS wiąże się z łańcuchem białka w stosunku 2 reszty aminokwasowe na 1 cząsteczkę. Niezależnie od początkowego ładunku białka, cząsteczka posiada znaczny ładunek ujemny, który jest proporcjonalny do swojej masy cząsteczkowej. Do przeprowadzenia elektroforezy sporządzono żele poliakrylamidowe. Bufor do elektroforezy TGS sporządzono, rozcieńczając 10 razy bufor o pH = 8,3 zawierający: tris – 30 g; glicynę – 144 g; SDS – 6 g; wodę destylowaną do objętości 100 mL. Bufor umożliwia utrzymanie właściwych warunków siły jonowej i pH do przebiegu elektroforezy. Tabela 1. Skład żeli poliakrylamidowych.

Odczynniki	Żel górny 4%	Żel dolny 10%
H ₂ O	6,1 mL	8 mL
1,5 M Tris-HCl	–	5 mL
0,5 M Tris-HCl	2,5 mL	–
10% SDS (dodecylo-siarczan sodu)	100 µL	200 µL
akryloamid /bisakryloamid	1,3 mL	6,7 mL
10% APS (nadsiarczan amonu)	50 µL	100 µL
TEMED (N,N,N',N'- tetrametyloetylenodiamina)	10 µL	10 µL

Wykonanie elektroforezy

Przygotowano żele o grubości 1,5 mm: zagęszczający - 4% oraz rozdzielający - 10% (Tab. 1). Czynniki sieciujące akrylamid - nadsiarazan amonu (APS) i N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminę (TEMED) - wykonano bezpośrednio przed ich zmieszaniem i nałożono ok. 8 mL do komory między szybkami aparatu do elektroforezy. Następnie na warstwę żelu naniesiono kilka mL wody, wyrównywującej żel i zapobiegającej jego wysychaniu w oczekiwaniu na jego polimeryzację. Po spolimeryzowaniu żelu odprowadzono warstwę wody. Do przestrzeni, która powstała został nałożony żel zagęszczający. Bezpośrednio przed nałożeniem dodano odczynniki APS i TEMED. Po nałożeniu grzebienia czekali, aż żel spolimeryzuje. Następnie, delikatnie usuwając grzebień żele umieszczano w aparacie do elektroforezy. Przestrzeń pomiędzy żelami uzupełniono buforem do elektroforezy TGS, w ten sposób, aby przykrywał powierzchnię żelu. W następnej kolejności do dołków naniesiono próbki. Do aparatu początkowo podłączono napięcie 100 V, kiedy próbki osiągnęły granicę żeli napięcie zwiększono do 120 V. Rozdział elektroforetyczny białek trwał ok. 1,5 h.

Transfer białek na membranę

Białka z żeli zostały przeniesione na membranę nitrocelulozową za pomocą metody elektrolitu. Po podłączeniu napięcia białka przemieściły się w kierunku do anody, na membranę.

Przeprowadzenie transferu

Po zakończonym procesie elektroforezy żele zostały wyjęte z komór, usunięto warstwy górne i umieszczono w komorze do transferu. Utworzono „kanapkę”, umieszczając w kasecie kolejno: dwie gąbki, papier, żel, membranę 7x10 cm, papier, dwie gąbki. Sporządzoną „kanapkę” umieszczono następnie w aparacie do elektroforezy, w ten sposób, aby membrana była położona bliżej anody niż żel. W aparacie został również umieszczony pojemnik z lodem i mieszadło magnetyczne (utrzymujące właściwą temperaturę i rozmieszczenie jonów). Aparat został uzupełniony buforem do transferu (bufor C z 20% metanolem). Transfer był przeprowadzony pod napięciem 50 V przez 120 min. Efekt przenoszenia białek na błony oceniono przeprowadzając ich barwienie czerwienią Ponceau S. Bufor do transferu został utworzony poprzez rozcieńczenie 10 razy buforu C, który zawierał: NaHCO_3 – 8,4 g; Na_2CO_3 – 3,18 g oraz dodając 200 mL metanolu na 1 litr H_2O .

Detekcja białek na membranie

W celu blokowania membrany przeprowadzono inkubację membrany w roztworach: mleka lub surowiczej albuminy wołowej (BSA) w 0,1% soli fizjologicznej buforowanej Tris z Tween 20

(TBS-T), celem zablokowania niespecyficznych wiązań z przeciwciałami. Membranę inkubowano z przeciwciałem I-rzędowym – swoistym dla badanego białka. Następnie przeprowadzono inkubację membrany z przeciwciałem II-rzędowym wiążącym przeciwciało I-rzędowe. Przeciwciała były skompleksowane z enzymem peroksydazą chrzanową. W dalszym postępowaniu przeprowadzono detekcję badanych białek metodą chemiluminescencji (z zastosowaniem chemiluminescence luminol reagent – ECL), przeprowadzono naświetlanie kliszy światłoczułej, wywołanie sygnału, analizę densytometryczną ekspresji badanych białek z użyciem oprogramowania TotalLab v 1.11. W tabeli 2 przedstawiono warunki analizy Western blot ustalone dla użytych przeciwciał.

Tabela 2. Warunki immunodetekcji zastosowane do analizy ekspresji białek metodą Western blot

Procedura	Białko PGC-1 α
Blokowanie	5% mleko w 0,1% TBS-T 60' temp. pokojowa
Płukanie	–
Inkubacja z I-rzędowym przeciwciałem (I Ab)	I Ab (Abcam, Cambridge, UK, ab 188102) 1:1000 w 5% mleko w 0,1% TBS-T, 12 h, 4oC
Płukanie	3x5' 0,1% TBS-T
Inkubacja z II-rzędowym przeciwciałem (II Ab)	Anti-rabbit 1:4000 w 5% mleku w 0,1% TBS-T, 1 h, temp. pokojowa
Płukanie	3x5' 0,1% TBS-T 1x5' TBS
ECL	5 min
Naświetlanie	2 s

4.7 Analiza statystyczna

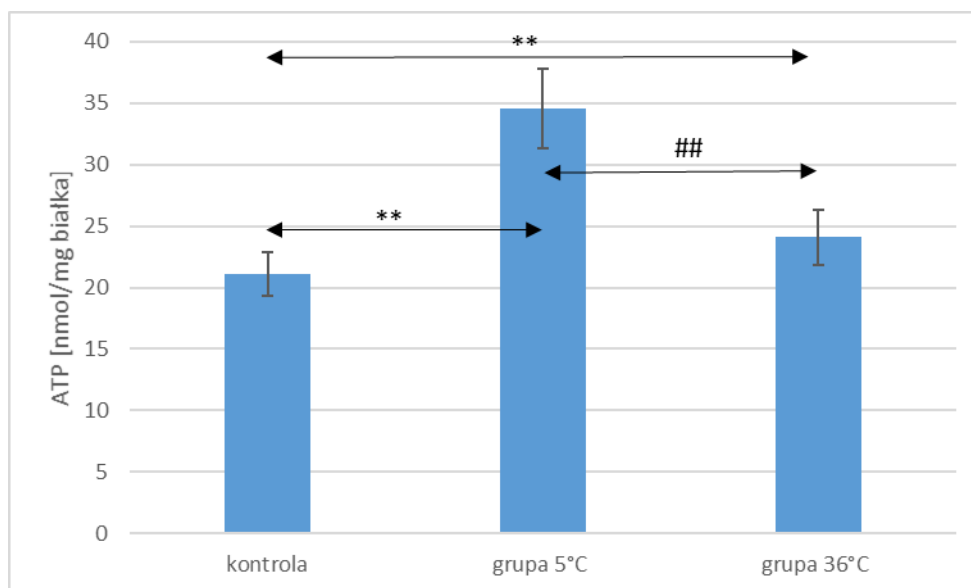
Uzyskane w doświadczeniach wyniki badań poddano analizie statystycznej, przy użyciu programów Excel oraz Statistica v 10. Przeprowadzono test Shapiro–Wilka celem zbadania czy rozkłady wartości wyników analizowanych zmiennych odbiegały od rozkładu normalnego. Następnie obliczono wartości średnie, odchylenia standardowe, mediany, minimum, maximum, kwartyle. W celu wykazania istotności różnic zastosowano test U Manna–Whitney'a. Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p \leq 0,05$.

5. WYNIKI

5.1 Stężenie adenozyno trifosforanu (ATP) w mięśniach szczurów

Stężenie ATP w mięśniach szkieletowych zwierząt istotnie różniło się między grupami. Stężenie ATP w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie (grupa 5°C) było istotnie wyższe zarówno w porównaniu do stężenia ATP w mięśniach samców z grupy kontrolnej (o ok. 64%, $p \leq 0.001$), jak i do tych, które poddane były treningowi w wodzie ciepłej (o ok. 30%, $p \leq 0.001$). W mięśniach samców pływających w ciepłej wodzie (grupa 36°C) zanotowano również wyższe stężenia ATP (o 14%) w stosunku do grupy kontrolnej ($p \leq 0.001$), (Ryc.7).

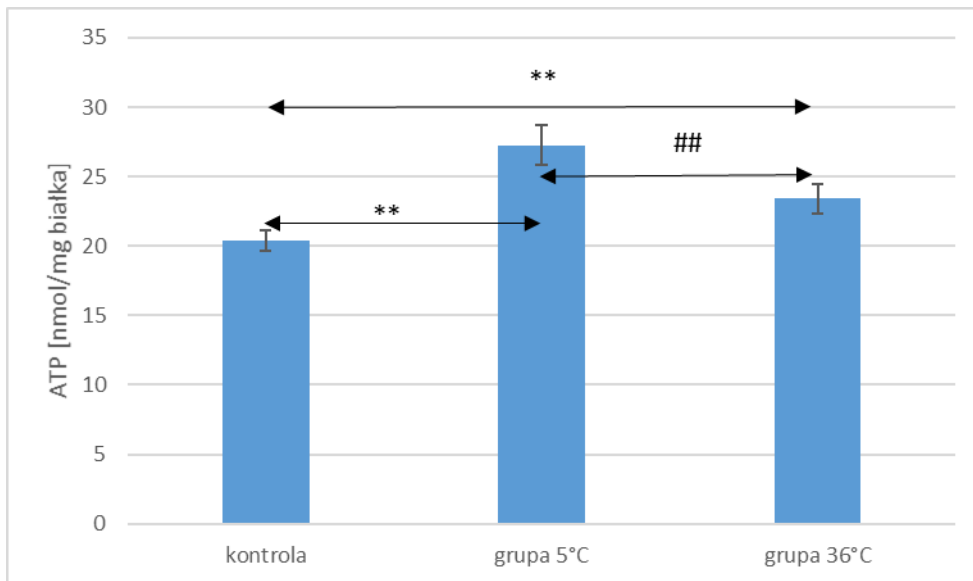
U samic pływających w zimnej wodzie również stwierdzono wyższe stężenie ATP w mięśniach (o ok. 33%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. U samic trenujących w wodzie ciepłej stężenie ATP w mięśniach było również wyższe (o ok. 15%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej. Stężenie ATP w mięśniach samic szczurów, które pływały w zimnej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie ciepłej było także istotnie wyższe (o ok. 16%, $p \leq 0.001$), (Ryc.8).



Rycina 7. Stężenie adenozyno trifosforanu (ATP) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy

kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



Rycina 8. Stężenie adenozylo trisfosforanu (ATP) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

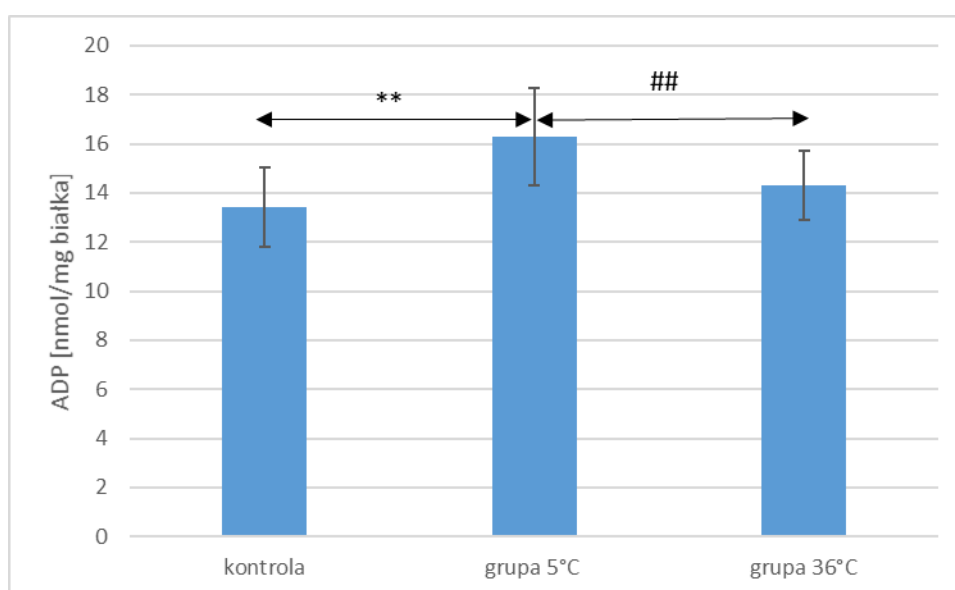
Na uwagę zasługuje także fakt zróżnicowania międzypłciowego w grupach poddanych sesjom pływackim, czego nie obserwuje się w grupach kontrolnych. Odnotowano wyższe wartości stężeń ATP u samców względem samic z obu grup badanych ($p \leq 0.001$ (grupy 5°C i $p \leq 0.002$ (grupy 36°C)).

5.2 Stężenie adenozylo difosforanu ADP w mięśniach szczurów

Stężenie ADP w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie było istotnie wyższe zarówno w porównaniu do stężenia w mięśniach samców z grupy kontrolnej (o ok. 21%, $p \leq 0.001$) jak i tych, które pływały w wodzie o temp. 36°C (o ok. 12%, $p = 0.003$). W mięśniach samców pływających w cieplej wodzie zanotowano również wyższe stężenia

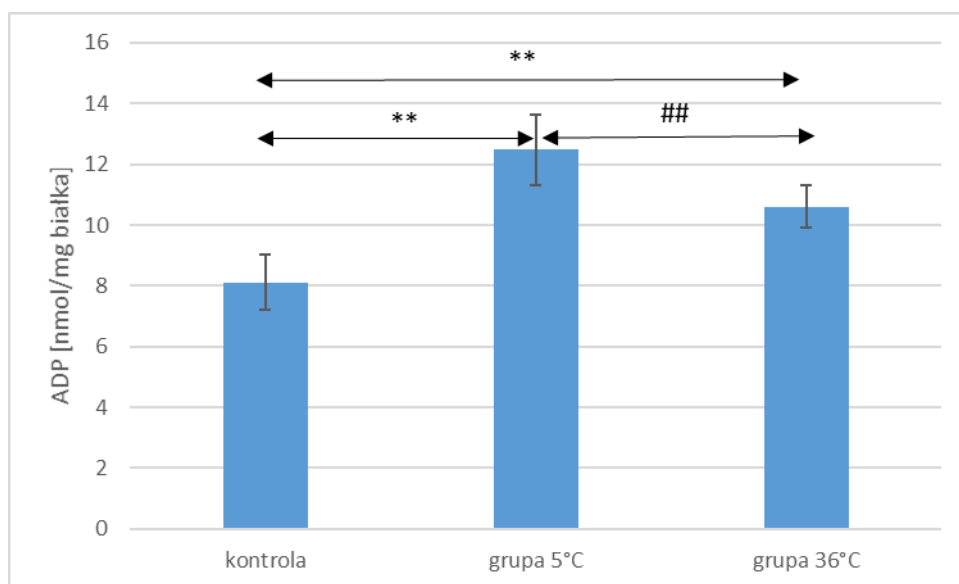
ADP (o ok. 6%, $p=0.157$) w porównaniu do kontroli, jednakże obserwowana różnica nie była statystycznie istotna. (Ryc. 9).

Stężenie ADP w mięśniach samic trenujących w zimnej wodzie było istotnie wyższe (o ok. 54%, $p\leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. U samic z grupy 36°C stężenie ADP w mięśniach było również wyższe (o ok. 30%, $p\leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie ADP w mięśniach samic szczurów, które pływały w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie zimnej było również istotnie niższe (o ok. 16%, $p\leq 0.001$), (Ryc. 10).



Rycina 9. Stężenie adenozyno difosforanu (ADP) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p<0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p<0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



Rycina 10. Stężenie adenozyno difosforanu (ADP) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

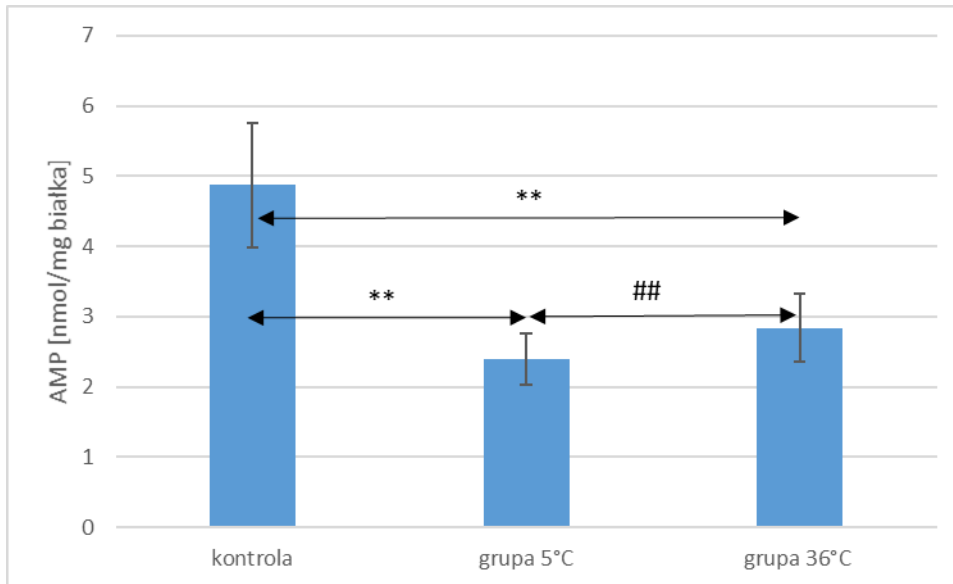
Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ### $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.3 Stężenie adenozyno monofosforanu (AMP) w mięśniach szczurów

Stężenie AMP w mięśniach samców szczurów, które trenowały w zimnej wodzie było istotnie niższe (o ok. 50%, $p = p \leq 0.001$) w porównaniu do zawartości tego związku w mięśniach samców z grupy kontrolnej. Podobnie w mięśniach samców trenujących w ciepłej wodzie zanotowano istotnie niższe stężenie AMP (o ok. 42%, $p \leq 0.001$) w stosunku do stężenia badanego związku w mięśniach zwierząt z grupy kontrolnej. Stężenie AMP w mięśniach samców, które pływały w wodzie ciepłej było istotnie wyższe niż w mięśniach samców trenujących w zimnej wodzie (o ok. 19%, $p = 0.0018$), (Ryc.11).

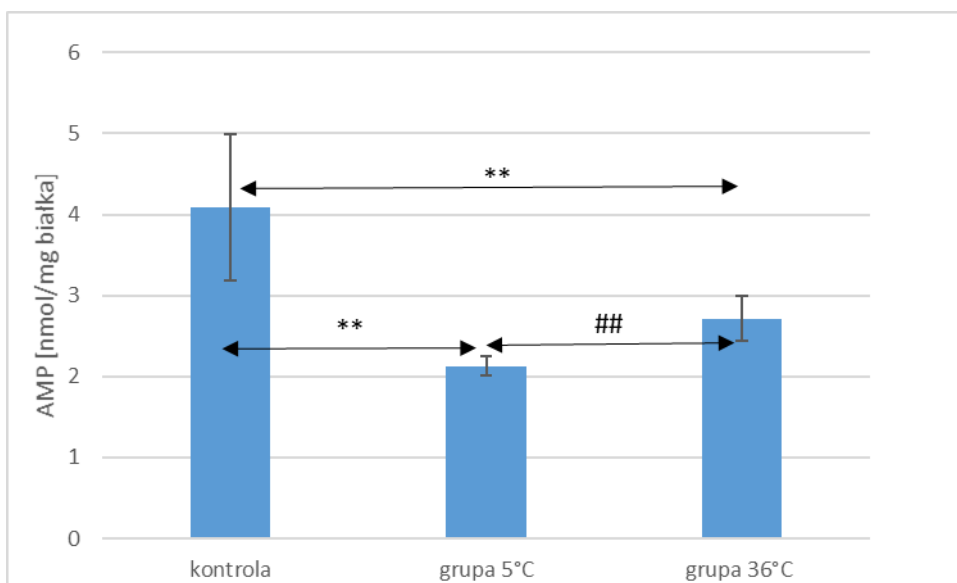
U samic trenujących w zimnej wodzie również stwierdzono niższe stężenie AMP w mięśniach (o ok. 48%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. U samic trenujących w wodzie ciepłej stężenie AMP w mięśniach było również niższe (o ok. 34%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do samic grupy kontrolnej. Stężenie AMP w mięśniach samic, które pływały w

cieplej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie zimnej było również istotnie wyższe (o ok. 28%, $p \leq 0.001$), (Ryc.12).



Rycina 11. Stężenie adenozyno monofosforanu (AMP) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



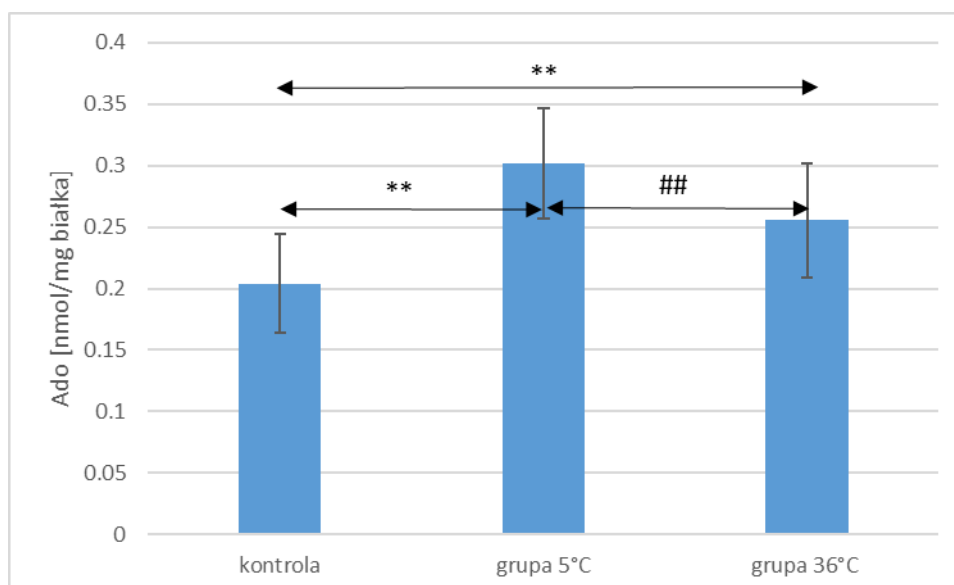
Rycina 12. Stężenie adenozyno monofosforanu (AMP) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.4 Stężenie adenozyiny (Ado) w mięśniach szczurów

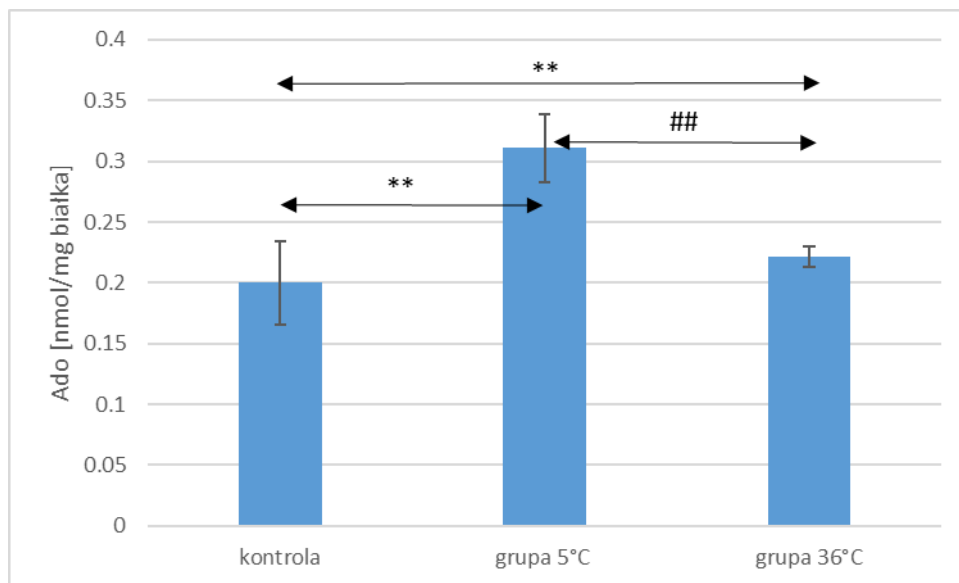
Stężenie Ado w mięśniach samców szczurów w grupie 5°C było istotnie wyższe (o ok. 48%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do stężenia w mięśniach samców z grupy kontrolnej. W mięśniach samców pływających w ciepłej wodzie zanotowano również wyższe stężenie ADP (o ok. 25%, $p = 0.002$) w porównaniu do kontroli. W mięśniach samców, które pływały w wodzie ciepłej stwierdzono istotnie niższe stężenie ADP w porównaniu do jego zawartości w mięśniach samców trenujących w zimnej wodzie (o ok. 15%, $p = 0.005$), (Ryc.13).

U mięśniach samic trenujących z grupy 5°C stwierdzono wyższe stężenie Ado w mięśniach (o ok. 55%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. U samic trenujących w wodzie ciepłej stężenie Ado w mięśniach było również wyższe (o ok. 10%, $p \leq 0.003$) w porównaniu do samic z grupy kontrolnej. Stężenie Ado w mięśniach samic, które pływały w ciepłej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie zimnej było istotnie niższe (o ok. 29%, $p \leq 0.001$), (Ryc.14).



Rycina 13. Stężenie adenozy (Ado) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



Rycina 14. Stężenie adenozy (Ado) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

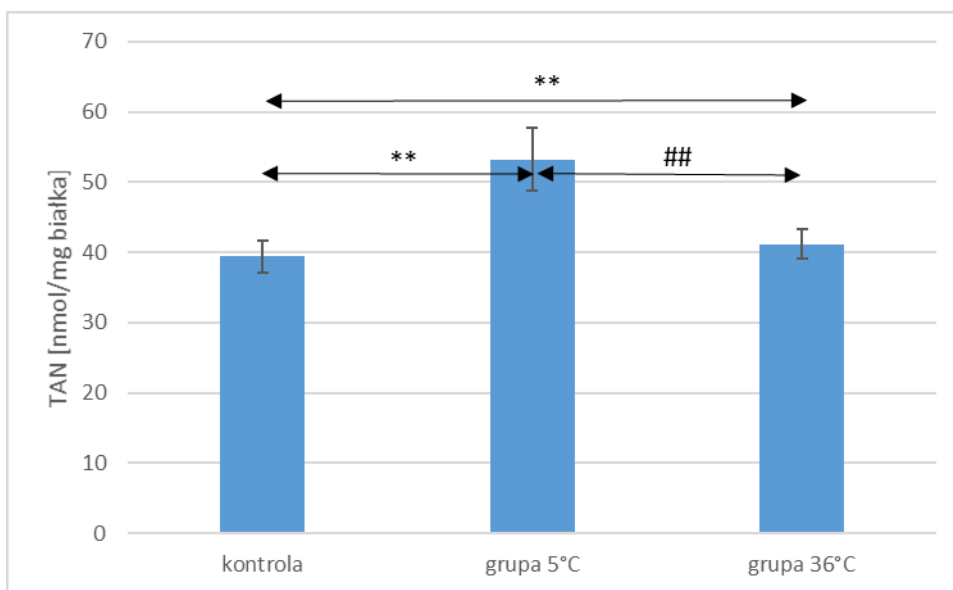
Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.5 Całkowita pula nukleotydów adenylanowych (TAN) w mięśniach szczurów

Całkowita pula nukleotydów (TAN) w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie była istotnie wyższe (o ok. 35%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do puli TAN w mięśniach samców z grupy kontrolnej. W mięśniach samców pływających w ciepłej wodzie zanotowano również wyższe stężenia TAN (o ok. 4.6%, $p = 0.009$) w porównaniu do kontroli.

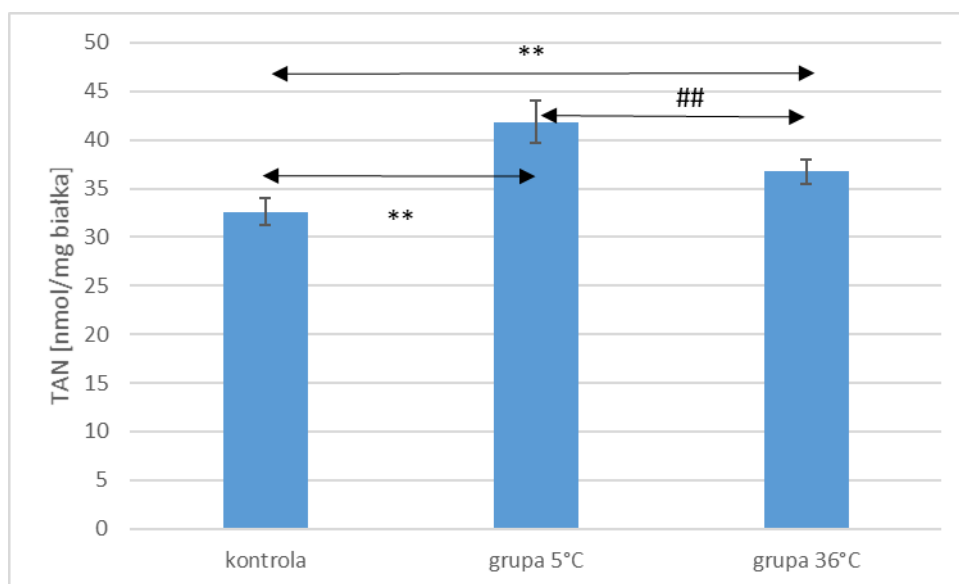
U samców trenujących w ciepłej wodzie stwierdzono istotnie niższe stężenie TAN w mięśniach w porównaniu do jego zawartości w mięśniach samców trenujących w zimnej wodzie (o ok. 23%, $p \leq 0.001$), (Ryc.15).

U samic trenujących w zimnej wodzie stwierdzono wyższe stężenie TAN w mięśniach (o ok. 28%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. U samic trenujących w wodzie ciepłej stężenie puli nukleotydów w mięśniach było również wyższe (o ok. 13%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do samic grupy kontrolnej. Stężenie TAN w mięśniach samic, które pływały w ciepłej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie zimnej było istotnie niższe (o ok. 12%, $p \leq 0.001$), (Ryc.16).



Rycina 15. Pula nukleotydów adeninowych (TAN) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



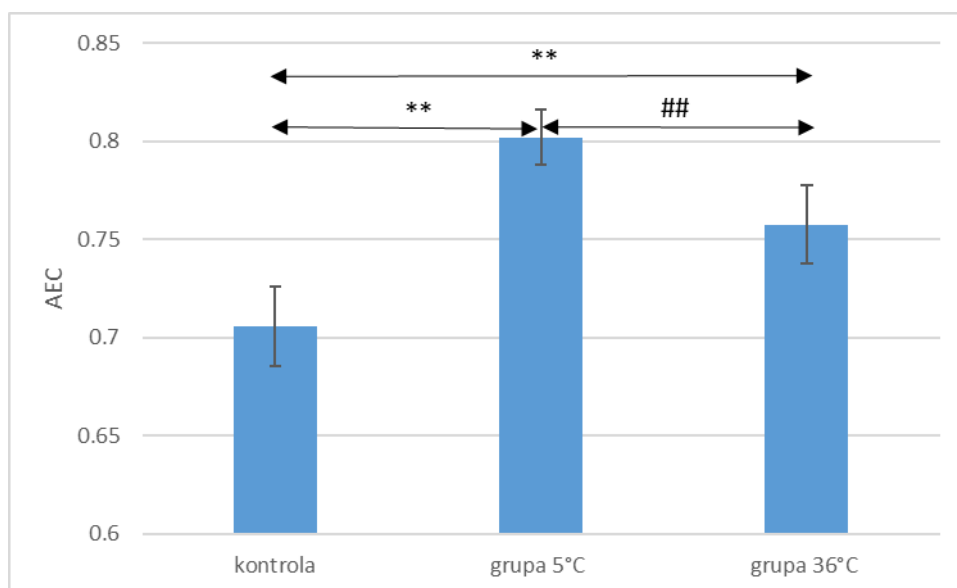
Rycina 16. Pula nukleotydów adeninowych (TAN) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.6 Wartość ładunku energetycznego adenylanów (AEC) w mięśniach szczurów

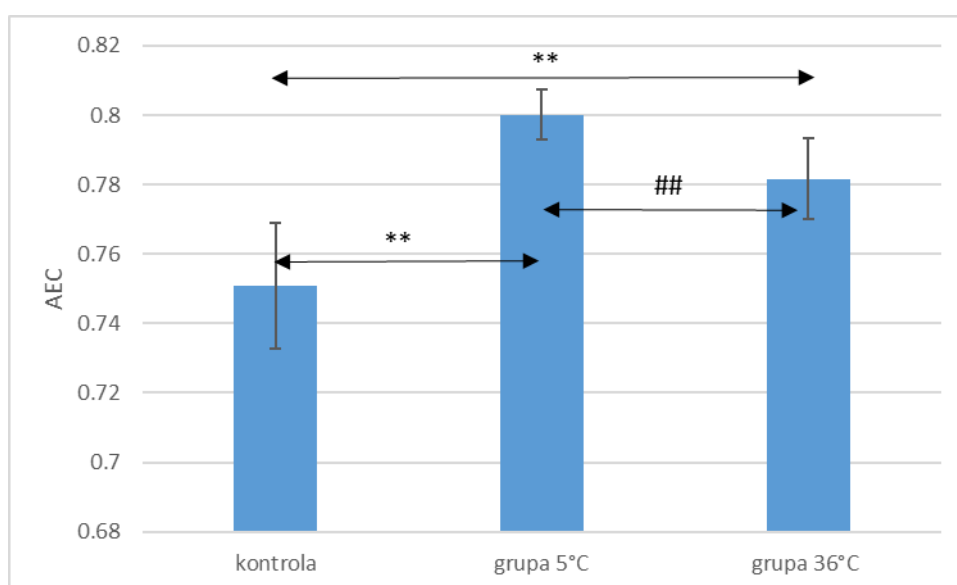
Wartość AEC w mięśniach samców szczurów z grupy 5°C była istotnie wyższa (o ok. 14%, $p \leq 0,001$) w porównaniu do stężenia w mięśniach samców z grupy kontrolnej. W mięśniach samców pływających w ciepłej wodzie zanotowano również wyższą wartość AEC (o ok. 7%, $p \leq 0,001$) w porównaniu do kontroli. Wartość AEC była istotnie niższa w mięśniach samców trenujących w ciepłej wodzie w porównaniu do wartości w mięśniach samców trenujących w zimnej wodzie (o ok. 5.5%, $p \leq 0,001$), (Ryc.17).

W mięśniach samic trenujących w zimnej wodzie stwierdzono wyższą wartość AEC (o ok. 6%, $p \leq 0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. U samic trenujących w warunkach komfortu cieplnego wartość AEC w mięśniach była również wyższa (o ok. 4%, $p \leq 0,001$) w porównaniu do samic grupy kontrolnej. Wartość AEC w mięśniach samic, które pływały w ciepłej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie zimnej była statystycznie istotnie niższa (o ok. 2%, $p \leq 0,001$), (Ryc.18).



Rycina 17. Wartość ładunku energetycznego adenylanów (AEC) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

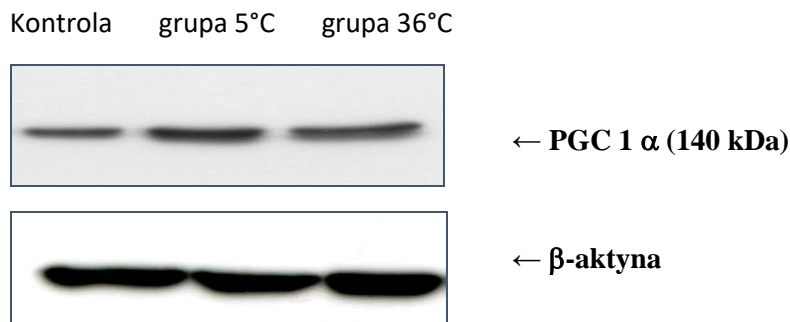


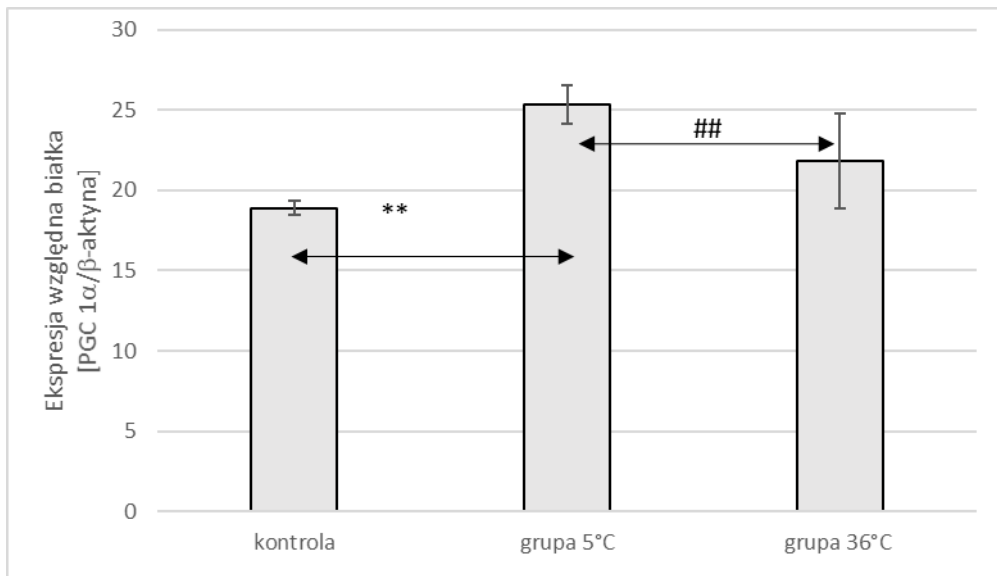
Rycina 18. Wartość ładunku energetycznego adenylanów (AEC) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

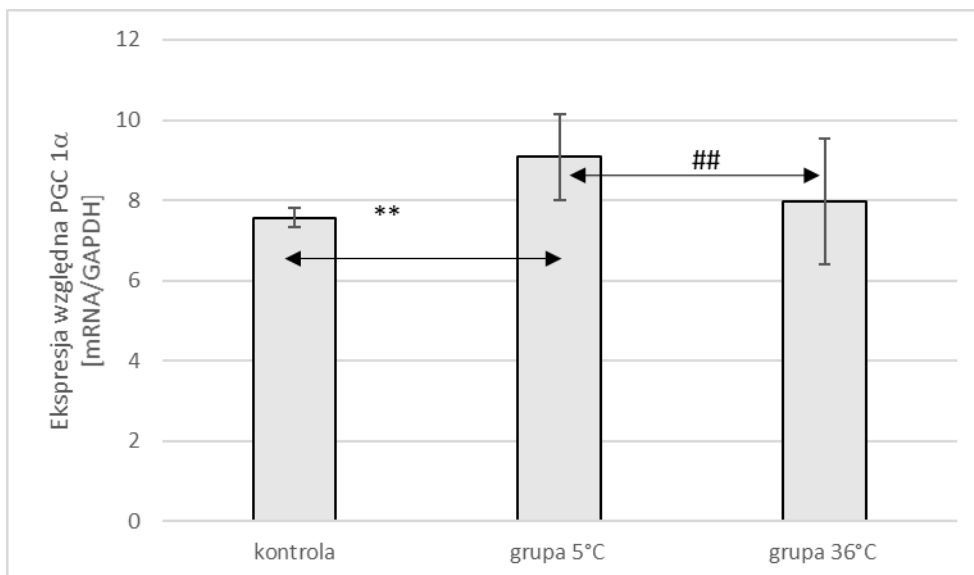
5.7. Ekspresja PGC-1 α w mięśniach szczurów

Ekspresja białka i mRNA PGC-1 α w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie była istotnie wyższa (odpowiednio o ok. 34%, $p \leq 0.001$ oraz 20%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do ekspresji w mięśniach samców z grupy kontrolnej. Takiej zależności nie stwierdzono w grupie samców trenujących w ciepłej wodzie vs kontrola. U samców trenujących w zimnej wodzie stwierdzono także istotnie wyższą ekspresję białka i genu PGC-1 α w mięśniach w porównaniu do jego ekspresji w mięśniach samców trenujących w ciepłej wodzie (o ok. 16%, $p \leq 0.001$ oraz 13%, $p \leq 0.001$), (Ryc.19). U samic trenujących w zimnej wodzie stwierdzono również wyższą ekspresję białka i mRNA PGC-1 α w mięśniach (o ok. 23%, $p \leq 0.001$ oraz 20%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja białka i mRNA PGC-1 α w mięśniach samic, które pływały w zimnej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie ciepłej była również istotnie wyższa (o ok. 10%, $p \leq 0.001$ oraz 14%, $p \leq 0.001$). Takiej zależności nie stwierdzono w grupie samic trenujących w ciepłej wodzie vs kontrola (Ryc. 20).





A.



B.

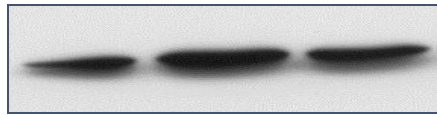
Rycina 19. Ekspresja PGC-1α w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

(A) Reprezentatywna analiza Western blot i analiza densytometryczna białka PGC-1α znormalizowanego wobec β-aktyny w mięśniach samców szczurów (B) Analiza densytometryczna poziomu mRNA PGC-1α, znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH.

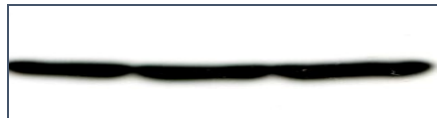
Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (36°C group) przez 9 tygodni. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Data represent the means ± SD for 6 independent experiments. ** p<0.001 poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej

(test U Manna-Whitneya). ## $p < 0.001$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

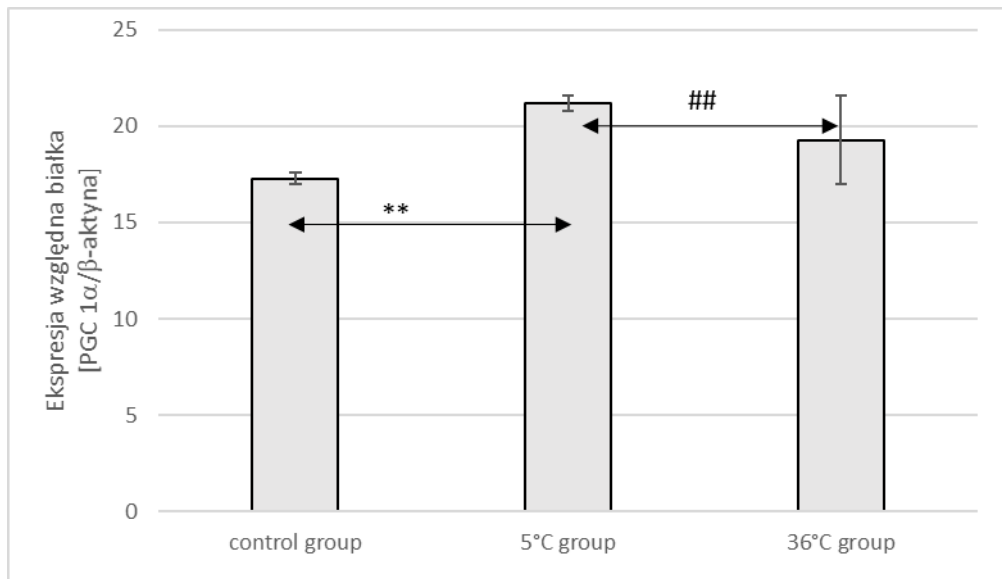
kontrola grupa 5°C grupa 36°C



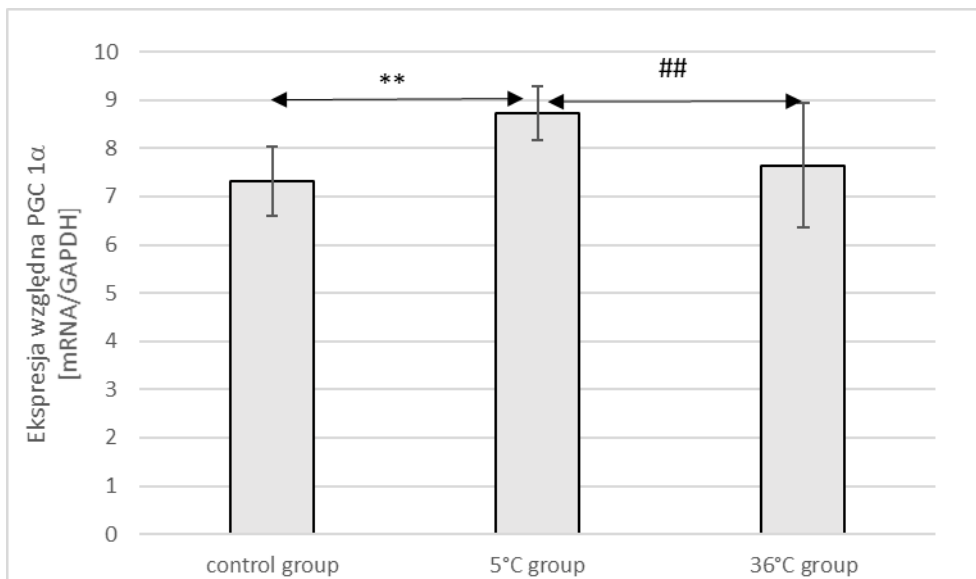
← PGC 1 α (140 kDa)



← β -aktyna



A.



B.

Rycina 20. Ekspresja PGC-1 α w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

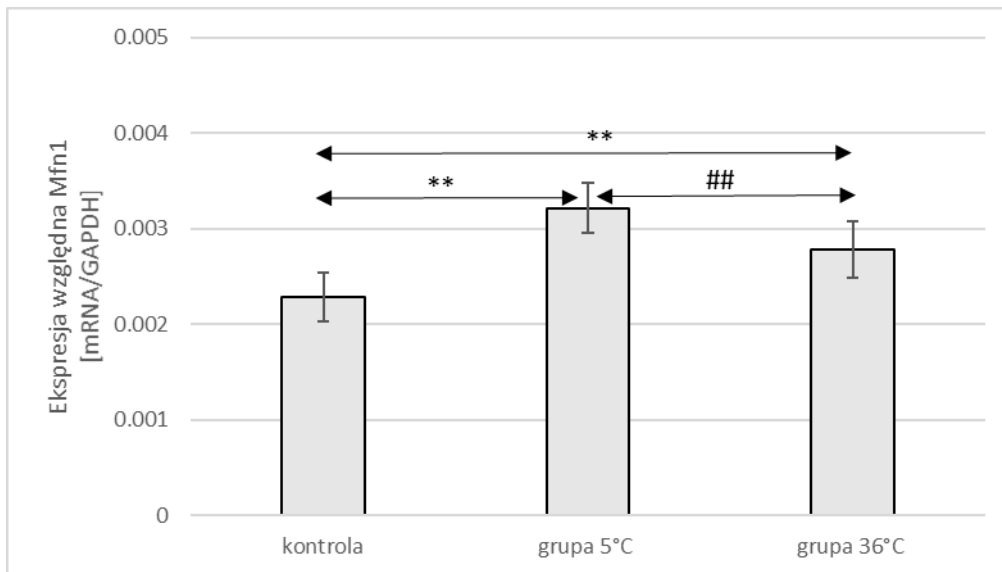
(A) Reprezentatywna analiza Western blot i analiza densytometryczna białka PGC-1 α znormalizowanego wobec β -aktyny w mięśniach samców szczurów (B) Analiza densytometryczna poziomu mRNA PGC-1 α , znormalizowana względem genu referencyjnego GAPDH.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (36°C group) przez 9 tygodni. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. Data represent the means \pm SD for 6 independent experiments. ** $p < 0.001$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0.001$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.8. Ekspresja Mfn1 w mięśniach szczurów

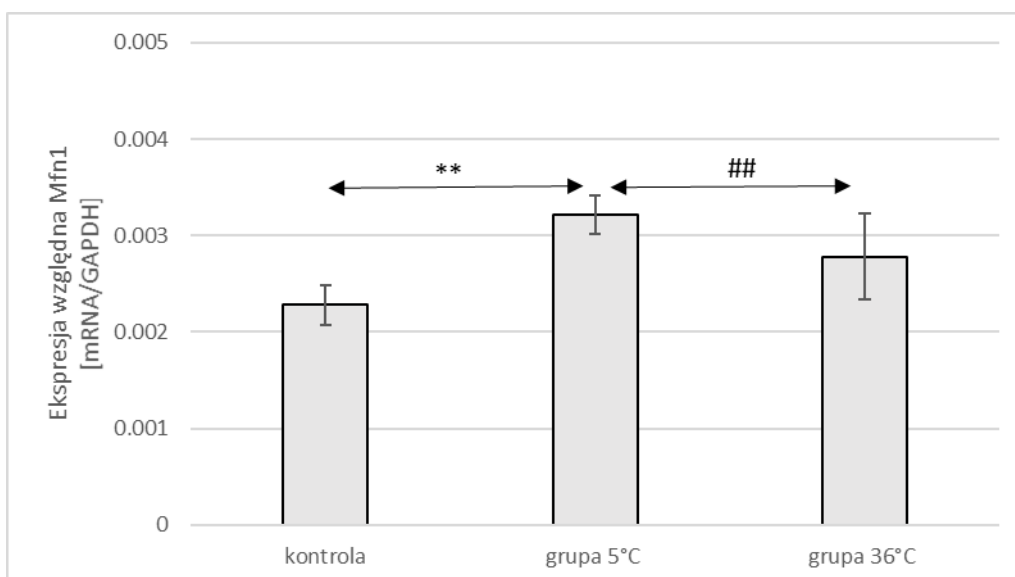
Ekspresja mRNA Mfn1 w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie była istotnie wyższa (odpowiednio o ok. 40%, $p \leq 0.007$) w porównaniu do jego ekspresji w mięśniach samców z grupy kontrolnej. W mięśniach samców pływających w ciepłej wodzie zanotowano również wyższą ekspresję mRNA Mfn1 (o ok. 22%, $p \leq 0.007$) w porównaniu do kontroli. U samców trenujących w zimnej wodzie ekspresja genu Mfn1 w mięśniach była istotnie wyższa w porównaniu do jego ekspresji w mięśniach samców trenujących w ciepłej wodzie (o ok. 15%, $p \leq 0.02$), (Ryc. 21).

U samic trenujących w zimnej wodzie stwierdzono również wyższą ekspresję genu Mfn1 w mięśniach (o ok. 75%, $p \leq 0.0002$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja mRNA Mfn1 w mięśniach samic, pływających w zimnej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie ciepłej była również istotnie wyższa (o ok. 66%, $p \leq 0.001$), (Ryc. 21).



Rycina 21. Ekspresja Mfn1 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu ciepłego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



Rycina 22. Ekspresja Mfn1 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

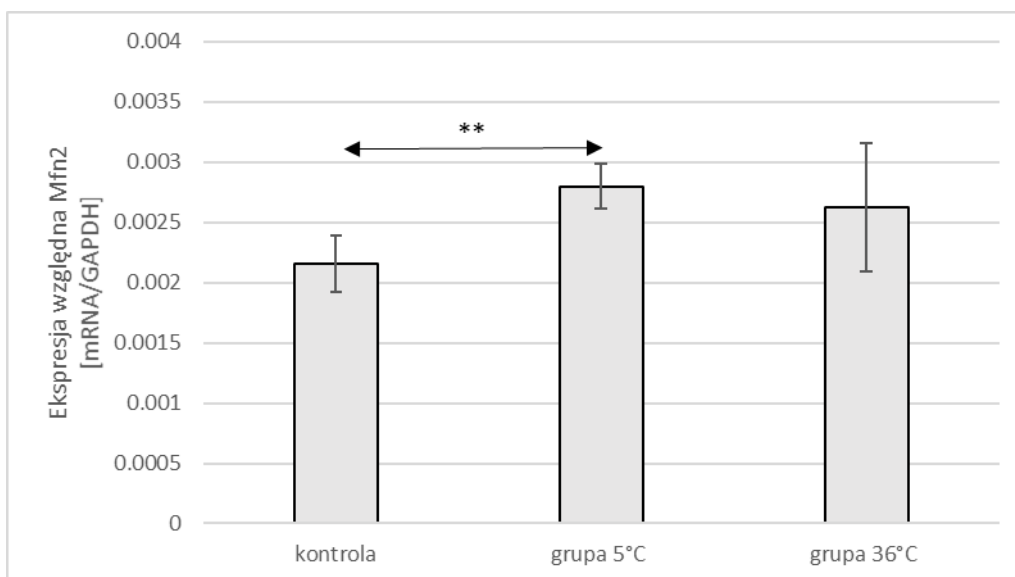
Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu ciepłego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9

tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.9. Ekspresja Mfn2 w mięśniach szczurów

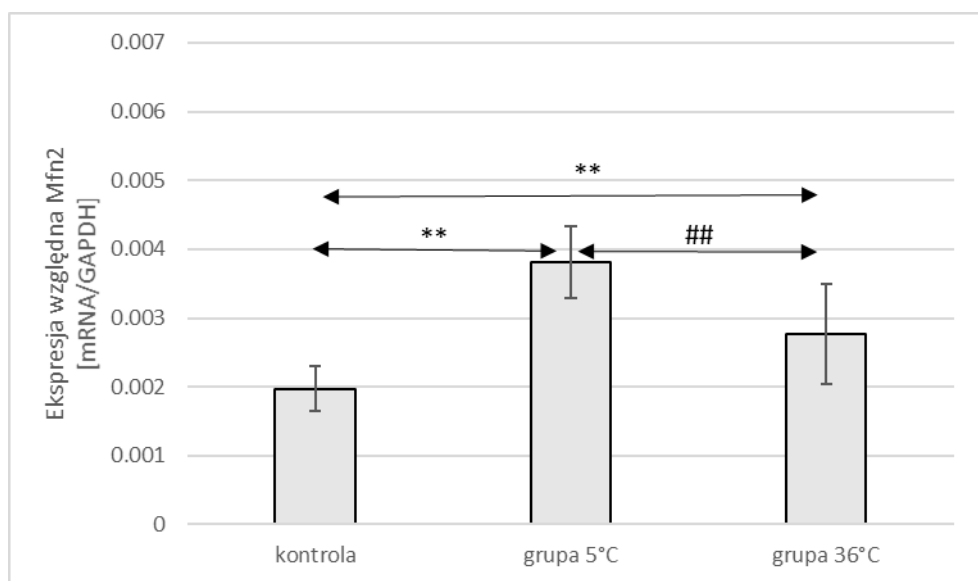
Ekspresja mRNA Mfn2 w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie była istotnie wyższa (odpowiednio o ok. 29%, $p \leq 0.02$) w porównaniu do jego ekspresji w mięśniach samców z grupy kontrolnej. Takiej zależności nie stwierdzono w grupie samców trenujących w ciepłej wodzie vs kontrola (Ryc. 24).

U samic trenujących w zimnej wodzie stwierdzono również wyższą ekspresję genu Mfn2 w mięśniach (o ok. 93%, $p \leq 0.002$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja mRNA Mfn2 w mięśniach samic, pływających w zimnej wodzie w porównaniu do tych, które odbywały trening w warunkach kontrolnych była istotnie wyższa (o ok. 40%, $p \leq 0.02$). Podobnie jak ekspresja mRNA Mfn2 w mięśniach samic, które pływały w zimnej wodzie w porównaniu do tych, które trenowały w wodzie ciepłej (o ok. 38%, $p \leq 0.008$), (Ryc. 24).



Rycina 23. Ekspresja Mfn2 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



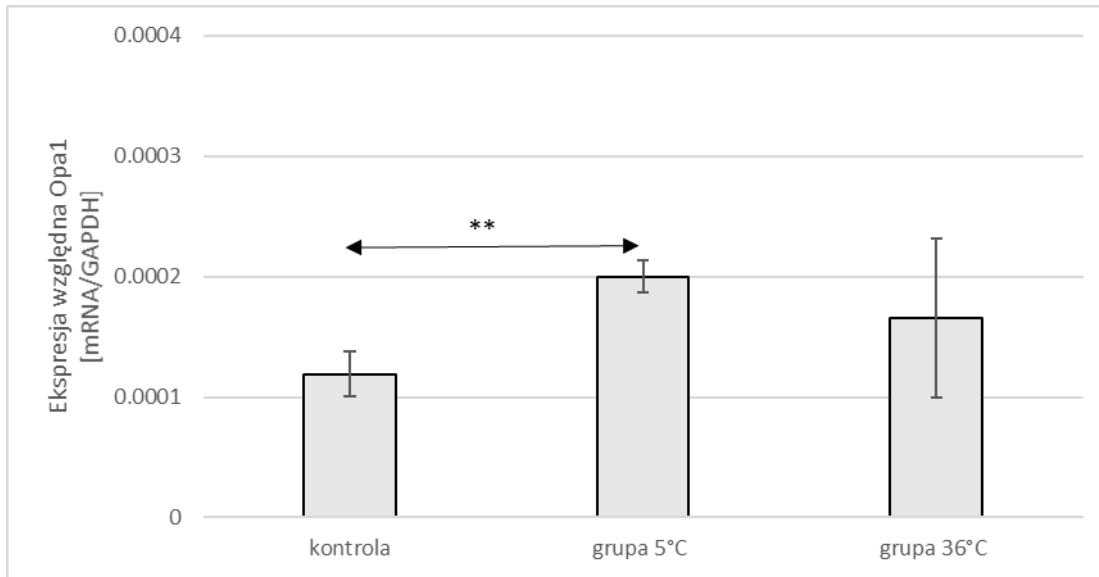
Rycina 24. Ekspresja Mfn2 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.10. Ekspresja Opa1 w mięśniach szczurów

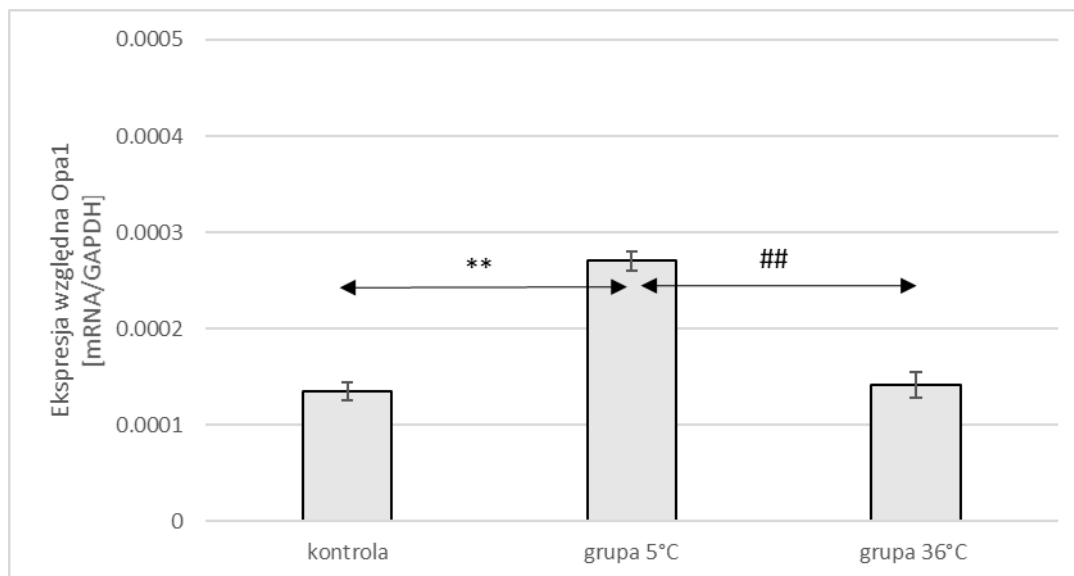
Ekspresja mRNA Opa1 w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie było istotnie wyższa (o ok. 68%, $p \leq 0.02$) w porównaniu do ekspresji genu w mięśniach samców z grupy kontrolnej, (Ryc. 25).

W mięśniach samic trenujących w zimnej wodzie stwierdzono również wyższą ekspresję genu Opa1 w mięśniach (o ok. 100%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja genu w mięśniach samic, które pływały w zimnej wodzie była również istotnie wyższa (o ok 90%, $p \leq 0.001$) w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie cieplej, (Ryc. 26).



Rycina 25. Ekspresja Opa1 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



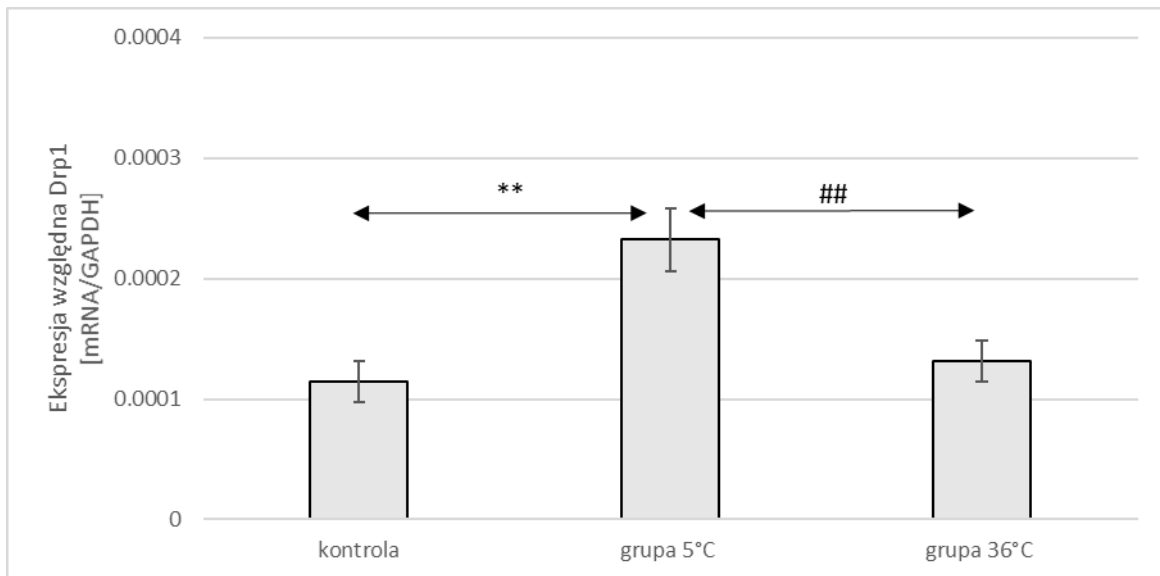
Rycina 26. Ekspresja Opa1 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

5.11. Ekspresja Drp1 w mięśniach szczurów

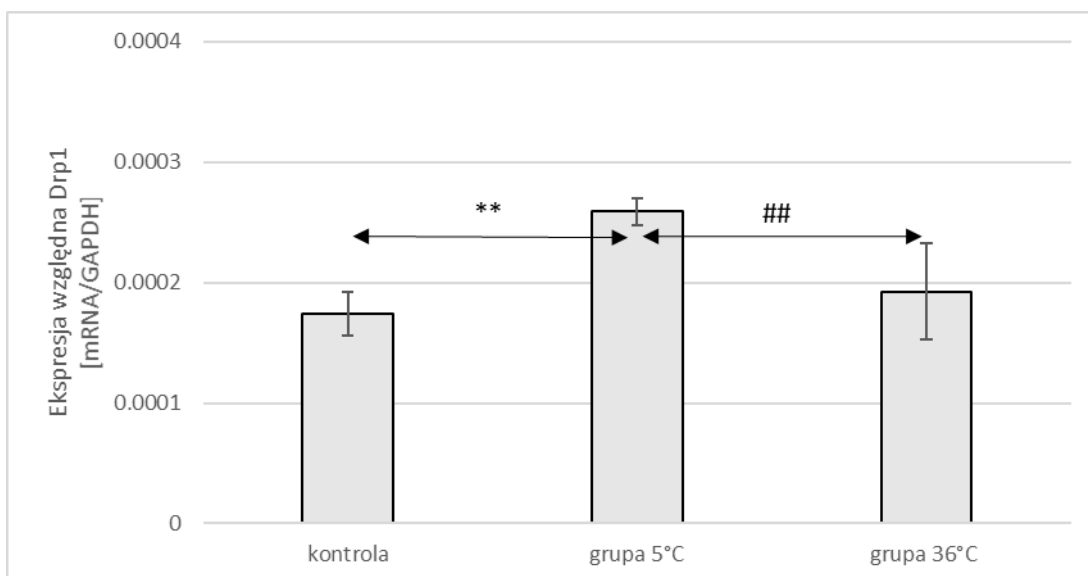
Ekspresja mRNA Drp1 w mięśniach samców szczurów pływających w zimnej wodzie była istotnie wyższa (o ok. 103%, $p \leq 0.02$) w porównaniu do ekspresji genu w mięśniach samców z grupy kontrolnej. Również ekspresja genu w mięśniach szczurów trenujących w zimnej wodzie była istotnie wyższa (o ok. 77%, 0.048) niż w mięśniach samców trenujących w wodzie ciepłej (Ryc. 27).

W mięśniach samic trenujących w zimnej wodzie stwierdzono również wyższą ekspresję genu Opa1 w mięśniach (o ok. 49%, $p \leq 0.007$) w porównaniu do grupy kontrolnej. W mięśniach samic, które pływały w zimnej wodzie trenowały ekspresja genu była także istotnie wyższa (o ok 35%, $p \leq 0.007$) w porównaniu do tych, które odbywały trening w wodzie ciepłej, (Ryc. 28).



Rycina 27. Ekspresja Drp1 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9 tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).



Rycina 28. Ekspresja Drp1 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych.

Szczury były poddawane treningowi pływackiemu w zimnej wodzie, w temperaturze 5°C (grupa 5°C) lub w temperaturze komfortu cieplnego w temp. 36°C (grupa 36°C) przez 9

tygodni. Zwierzęta grupy kontrolnej przebywały w warunkach sedenteryjnych. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Wyniki przedstawiono jako średnie i odchylenia standardowe. ** $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy kontrolnej (test U Manna-Whitneya). ## $p < 0,005$ poziom istotności statystycznej wobec grupy 5°C (test U Manna-Whitneya).

Podsumowanie

1. Pływanie w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego wpłynęło na poprawę metabolizmu energetycznego mięśni starzejących się szczurów poprzez zwiększenie tempa metabolizmu (wyrażone jako zwiększenie stężenia ATP, ADP, TAN, AEC) oraz nasilenie fuzji mitochondrialnej (wyrażone jako zwiększenie ekspresji mRNA białek regulujących Mfn1, Mfn2).
2. Pływanie w zimnej wodzie wpłynęło na poprawę metabolizmu energetycznego mięśni starzejących się szczurów poprzez zwiększenie tempa metabolizmu energetycznego mięśni (wyrażone jako zwiększenie stężenia ATP, ADP, TAN, AEC) oraz nasilenie biogenezy i dynamiki mitochondriów (wyrażone jako zwiększenie ekspresji mRNA białek czynników regulujących fuzję Mfn1, Mfn2, Opa1 oraz fuzję mitochondriów Drp1).
3. Stężenie związków wysokoenergetycznych i ekspresja białek regulujących dynamikę mitochondriów w mięśniach mogą być przydatnym wskaźnikiem w monitorowaniu zmian adaptacyjnych zachodzących w starzejących się mięśniach pod wpływem wysiłku fizycznego w zimnej wodzie.
4. Można przypuszczać, że fuzja jest niezbędna do optymalizacji funkcji mitochondriów, aby umożliwić komórkom mięśniowym sprostać zwiększonemu zapotrzebowaniu na energię podczas wysiłku fizycznego w zimnej wodzie. Stanowi krótkoterminową adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych oraz wpływa korzystnie na utrzymanie bioenergetycznej wydolności mięśni w dłuższym czasie.

5. DYSKUSJA

Przeprowadzone badania nad wpływem codziennej aktywności pływackiej szczurów w wodzie zimnej (o temp. 5°C) i w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego (36°C) przez okres 8 tygodni na parametry stanu energetycznego, zawartość związków purynowych, biogenezę i dynamikę mitochondriów w mięśniach szkieletowych starzejących się szczurów, wykazały istotny wpływ aktywności fizycznej w środowisku wodnym na status energetyczny i czynniki regulacyjne biogenezy mitochondriów w tkance mięśniowej. Oddziaływanie to wyrażało się wyższym stężeniem ATP, ADP, Ado, niższym stężeniem AMP, zwiększoną wartością AEC i TAN z jednocześnie zwiększoną ekspresją mRNA i białka PGC-1 α , zwiększoną ekspresją mRNA Mfn1, Mfn2, Opa1 oraz Drp1. Co należy podkreślić, względem stawianych hipotez, działanie to było istotnie silniejsze w przypadku aktywności w środowisku zimnej wody w porównaniu do aktywności w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego.

Obserwowany kierunek wpływu powtarzanych sesji pływackich w zimnej wodzie na wskaźniki stanu energetycznego, stężenie związków purynowych, biogenezę i dynamikę mitochondriów był niezależny od płci zwierząt, skutkowałam bowiem podwyższeniem wartości wszystkich badanych zmiennych (z wyjątkiem obniżenia stężenia AMP). Natomiast w warunkach treningu pływackiego w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego odpowiedź była zależna od płci zwierząt. U samców trening pływacki skutkowałam wzrostem stężenia ATP, Ado, obniżeniem stężenia AMP, bez wpływu na stężenie ADP oraz wzrostem wartości AEC i TAN. U samic spowodowałam wzrost stężenia ATP, ADP, Ado, obniżenie stężenia AMP oraz wzrost wartości AEC i TAN. W mięśniach samców i samic pływających w ciepłej wodzie nie stwierdzono natomiast zmian w ekspresji mRNA i białek związanych z biogenezą mitochondriów, z wyjątkiem wzrostu ekspresji mRNA białek fuzji zewnętrznej błony mitochondrialnej Mfn1 u samców i Mfn2 u samic. Można zatem stwierdzić, że addytywne oddziaływanie codziennej aktywności w zimnej wodzie wywarło wpływ zarówno na zwiększenie tempa metabolizmu energetycznego w mięśniach badanych zwierząt jak i na nasilenie biogenezy i dynamiki mitochondriów (na procesy związane z ich fuzją i fragmentacją). Codzienna aktywność zwierząt w ciepłej wodzie również skutkowałam zwiększeniem tempa metabolizmu energetycznego mięśni, ale jednocześnie nie spowodowałam znaczących zmian w dynamice mitochondriów.

Pływanie w zimnej wodzie

W dotychczasowej literaturze brak jest danych dotyczących wpływu treningu pływackiego w zimnej wodzie na metabolizm energetyczny, biogenezę i dynamikę mitochondriów w starzejących się mięśniach szkieletowych, dlatego trudno jest odnieść otrzymane przez nas wyniki do wyników innych autorów. Natomiast pływanie w zimnej wodzie, znane również jako pływanie zimowe lub pływanie w lodowatej wodzie opisujące pływanie na świeżym powietrzu (w jeziorze, rzece, morzu, odkrytym basenie) głównie zimą w zimniejszych i polarnych regionach jest znane od dawna [IWSA 2021]. W niektórych krajach północnych, takich jak Finlandia, Rosja, Norwegia, Szwecja, Dania, Estonia, Litwa, Czechy, Łotwa i Polska pływanie w zimnej wodzie jest popularne i regularnie praktykowane w chłodniejszych porach roku [Knechtle i wsp. 2020]. W ostatnich latach pływanie w lodowatej wodzie (w wodzie o temperaturze poniżej 5°C) przekształciło się w sport całoroczny, w którym wielu pływaków regularnie rywalizuje w zawodach lokalnych i międzynarodowych [IISA 2021]. Jednocześnie należy wziąć pod uwagę, że sportowe pływanie w zimnej wodzie różni się od zanurzenia w zimnej wodzie często praktykowanego przez osoby nie będące sportowcami. Trening sportowy obejmuje intensywny wysiłek fizyczny przez dłuższy czas (kilkanaście minut, a nawet kilka godzin), podczas gdy amatorzy pozostają zanurzeni w wodzie przez kilka minut bez nadmiernej aktywności fizycznej [Knechtle i wsp. 2020, Knechtle i wsp. 2021].

Wyniki licznych badań wskazują, że pływanie w zimnej wodzie może przynieść wiele korzyści zdrowotnych [Gibas-Dorna i wsp. 2016a], w tym wpływać na obniżenie ciśnienia tętniczego krwi [Zenner i wsp. 1980, Kralova i wsp. 2015, Brož i wsp. 2017, Manolis i wsp. 2019, Huttunen i wsp. 2000], równowagę hormonalną [Kauppinen i wsp. 1989, Huttunen i wsp. 2001, Gundle i wsp. 2020], skutkować wzrostem wrażliwości tkanek na insulinę [Kauppinen i wsp. 1989, Hermanussen i wsp. 1995, Gibas-Dorna i wsp. 2016a, Gibas-Dorna i wsp. 2016a], zmniejszeniem częstości występowania i łagodzeniem przebiegu infekcji górnych dróg oddechowych [Kormanovski i wsp. 2010, Eccles i wsp. 2015, Collier i wsp. 2021], korzystnie wpływać na metabolizm lipidów [Kauppinen i wsp. 1989, Dulac i wsp. 1987, Kralova i wsp. 2015, Checinska-Maciejewska i wsp. 2017], poprawę parametrów hematologicznych [Weisło i wsp. 2014, Teległów i wsp. 2015], stymulować układ odpornościowy [Jansky i wsp. 1996, Lubkowska i wsp. 2013, Mila-Kierzenkowska i wsp. 2012, Brazaitis i wsp. 2014], łagodzić zaburzenia nastroju [Van Tulleken i wsp. 2018] i poprawiać ogólne samopoczucie [Huttunen i wsp. 2004].

W kilku badaniach opisano pozytywny wpływ pływania w zimnej wodzie na układ sercowo-naczyniowy i czynniki ryzyka chorób serca jak profil lipidowy [Kralova i wsp. 2015,

Gibas-Dorna i wsp. 2016a, Gibas-Dorna i wsp. 2016b, Checinska-Maciejewska i wsp. 2017], ciśnienie tętnicze krwi [Huttunen i wsp. 2000] oraz stężenie katecholamin, insuliny, hormonu tyreotropowego (TSH), hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) i kortyzolu [Hermanussen 1995, Dulac i wsp. 1987, Knechtle i wsp. 2020, Knechtle i wsp. 2021]. Wykazano, że pływanie zimą, jako forma treningu wytrzymałościowego, może poprawiać przystosowanie się do stresu. W badaniach z udziałem kobiet i mężczyzn w wieku od 48 do 68 lat uprawiających pływanie zimowe w naturalnych zbiornikach wodnych zaobserwowano spadek stężenia triacylogliceroli i niższe stężenie homocysteiny we krwi [Checinska-Maciejewska i wsp. 2017]. Wykazano również, że pływanie w zimnej wodzie może mieć pozytywny wpływ na stężenie insuliny we krwi [Gibas-Dorna i wsp. 2016a, Checinska-Maciejewska i wsp. 2017]. Gibas-Dorna i wsp. przeprowadzili trwające pół roku badania w grupie osób uprawiających pływanie w zimnej wodzie pod kątem składu ciała i wrażliwości tkanek na insulinę. Autorzy pracy zaobserwowali korzystny wpływ pływania w zimnej wodzie na zmniejszenie wydzielania insuliny oraz zwiększenie wrażliwości tkanek na insulinę w grupie kobiet i w grupie mężczyzn z niższym procentem tkanki tłuszczowej [Gibas-Dorna i wsp. 2016a]. Korzystny wpływ niskiej temperatury wody na obniżenie stężenia ACTH i kortyzolu we krwi stwierdzono w badaniach osób zanurzających się w wodzie o temp. 0–2°C przez 20 s trzy razy w tygodniu przez 3 miesiące zimowe [Leppäluoto i wsp. 2008]. Stwierdzono ponadto, że pływanie w zimnej wodzie, ze względu na wzrost stężenia katecholamin we krwi, może być skuteczne w leczeniu depresji, ponieważ aktywuje współczulny układ nerwowy oraz zwiększa stężenie noradrenaliny i β -endorfin [Shevchuk 2008, Van Tulleken i wsp. 2018]. Natomiast Huttunen i wsp. stwierdzili, że regularne trzymiesięczne zimowe pływanie skutkowało spadkiem stężenia katecholamin we krwi mierzonych bezpośrednio po zanurzeniu. Autorzy pracy stwierdzali, że adaptacja poprzez nawykowe narażenie na chłód zimowego pływania może osłabiać odpowiedź fizjologiczną i poprzez ten mechanizm obniżać stężenie katecholamin [Huttunen i wsp. 2001]. Wykazano również, że pływanie w zimnej wodzie może wpływać pozytywnie na ogólną poprawę samopoczucia [Huttunen i wsp. 2004, Lindeman i wsp. 2002, Bottley 2019]. Regularne pływanie zimą prowadziło także do poprawy ogólnego samopoczucia pływaków, którzy cierpieli na reumatyzm, fibromialgię lub astmę [Huttunen i wsp. 2004].

Wyniki dotychczasowych badań potwierdzają, że u osób uprawiających pływanie w zimnej wodzie częstość występowania infekcji dróg oddechowych jest o 40% niższa i mają one łagodniejszy przebieg w porównaniu do osób nieaktywnych [Brenke 1990, Siems i wsp.

1999]. Ponadto wykazano, że pływanie w zimnej wodzie wywiera korzystny wpływ na parametry immunologiczne krwi [Lombardi i wsp. 2011, Lubkowska i wsp. 2013]. Poprawa odpowiedzi immunologicznej organizmu może być spowodowana uwalnianiem hormonów stresu w odpowiedzi na ekspozycję na zimno [Johnson i wsp. 1977, Kauppinen i wsp. 1989]. Stwierdzono, że krótkotrwały stres fizjologiczny, jakim jest narażenie na zimno, aktywuje układ odpornościowy [Dhabhar i wsp. 2014]. Badanie wpływu pływania w zimnej wodzie na liczbę leukocytów i stężenie immunoglobulin przyniosło jednakże sprzeczne wyniki. Prawdopodobną przyczyną rozbieżności wyników mogą być różne protokoły badań, do których włączani byli uczestnicy np. tylko zanurzający się w lodowatej wodzie [Dugué i wsp. 2000], uprawiający statyczne pływanie (pozostawanie w zimnej wodzie bez ruchu przez dłuższy czas) [Janský i wsp. 1996] oraz pływacy dystansowi, których trening może trwać nawet przez 6-8 godzin (dynamiczne pływanie w zimnej wodzie) [Kormanovski i wsp. 2010]. W innych badaniach sprawdzano reakcje układu odpornościowego na pływanie w zimnej wodzie u uczestników początkowo tylko zanurzających się w zimnej wodzie, a następnie powtarzających pływanie w zimnej wodzie trzy razy w tygodniu przez sześć tygodni. Badani regularnie pływali zimą, co najmniej raz w tygodniu, przez 2 do 10 minut, w wodzie o temperaturze 6,8°C (w październiku) do 2,0°C (w styczniu) w południowym Bałtyku. Zaobserwowano, że regularne pływanie w zimnej wodzie wpłynęło na zwiększenie liczby leukocytów we krwi badanych, bez zmiany w stężeniu immunoglobulin [Janský i wsp. 1996]. Badano również reakcję na okresowe zanurzanie w zimnej wodzie o temperaturze 14°C i zaobserwowano, że uczestnicy badania wykazali różną szybkość wychłodzenia organizmu, a osoby, które wychładzały się wolniej, miały zwiększoną liczbę leukocytów we krwi po zakończeniu badań [Brazaitis i wsp. 2014]. Stąd wydaje się, że odpowiedź immunologiczna organizmu na statyczne pływanie w zimnej wodzie zależy w dużym stopniu od protokołu badania i osobniczej zmienności uczestników oraz może odpowiadać sile i czasowi trwania stresu. Janský i wsp. nie stwierdzili wzrostu liczby granulocytów obojętnochłonnych po 60 minutach przebywania badanych w wodzie o temperaturze 14°C [Janský i wsp. 1996], podczas gdy inni badacze wykazali wzrost ich liczby o 55% po łącznie 120 min przebywania w zimnej wodzie o temperaturze 14°C z okresowym dogrzewaniem [Brazaitis i wsp. 2014]. W badaniu przeprowadzonym w grupie pływaków bezpośrednio przed i po zimowym pływaniu na 150 m w temperaturze 6°C wykazano, że liczba granulocytów, neutrofilów, limfocytów i monocytów we krwi uczestników znacznie wzrosła [Lombardini i wsp. 2011]. W badaniach Lubkowska i wsp. również wykazano wzrost odsetka monocytów i granulocytów we krwi zdrowych mężczyzn, którzy przez pięć zimowych miesięcy regularnie

pływali w zimnej wodzie. Autorzy pracy stwierdzili, że uzyskane wyniki badań mogą wskazywać na pozytywne zmiany adaptacyjne w układzie antyoksydacyjnym organizmu zachodzące u badanych mężczyzn [Lubkowska i wsp. 2013]. W innych badaniach przeprowadzonych z udziałem wytrenowanych pływaków trenujących w zimnej wodzie stwierdzono wyższe stężenie leukocytów niż u uczestników nie zaadaptowanych do tych warunków oraz uczestników zanurzających się na krótko w lodowatej wodzie. Wyniki tych badań miały jednakże istotne ograniczenia ponieważ uczestnicy korzystali bezpośrednio po pływaniu z sauny, stąd też nie można oddzielić skutków tych dwóch zakresów temperatur [Dugué i wsp. 2000]. Kormanovski i wsp. [2010] przebadali 15 doświadczonych pływaków długodystansowych w okresie sześciu miesięcy. Siedmiu pływaków z grupy badanej ukończyło trzy pływania długodystansowe, pierwsze przez 6 h (w miesiącu 1) i dwa pozostałe po 8 h (w miesiącach 3 i 6), podczas gdy pozostali uczestnicy nie pływali. Stwierdzono różnice w liczbie leukocytów i stężeniu immunoglobulin we krwi między grupą pływaków długodystansowych a grupą kontrolną, zarówno po zakończonych badaniach, jak i w okresach między pływaniem długodystansowym. Duże obciążenie treningowe spowodowało nieistotne obniżenie liczby leukocytów u pływaków długodystansowych w fazie bezstresowej, ale obciążenie treningiem pływackim wywołało zauważalny wzrost ich liczby. Pływacy długodystansowi w badaniu Kormanovski i wsp. 2010 nie wykazali znaczących zmian w liczbie neutrofilów po 1 godzinie, ale po 2 godzinach ich liczba wzrosła o ~50%, a po 8 godzinach czterokrotnie. Pływacy nie zaaklimatyzowani w badaniu Lombardiego i wsp. [2011] wykazali najszybszą odpowiedź z 38% wzrostem liczby neutrofilów po wyścigu na ponad 150 m. W obu cytowanych badaniach różny był poziom adaptacji uczestników do zimnej wody, pływacy w badaniu Kormanovski i wsp. [2010] byli bardzo dobrze wyszkoleni, podczas gdy biorący udział w badaniach Lombardi i wsp. [2011] nie podlegali adaptacji do warunków.

Dotychczas przeprowadzono kilka badań, w których wskaźnikiem funkcji immunologicznych organizmu była częstość występowania infekcji górnych dróg oddechowych u pływaków w zimnej wodzie. W badaniach przeprowadzonych przez Brenke przebadano 85 pływaków lodowych, którzy regularnie uczestniczyli w pływaniu w zimnej wodzie (trening i zawody), z których 40% stwierdziło, że doświadczyli mniej, bardziej łagodnych i krócej trwających infekcji górnych dróg oddechowych niż zanim zaczęli regularnie pływać w lodzie [Brenke 1990].

Pomimo doniesień o korzyściach płynących z pływania w zimnej wodzie, istnieje również wiele dowodów o ich potencjalnych zagrożeniach. W badaniu Collier i wsp. 2021 odnotowali dodatnią korelację między występowaniem i nasileniem infekcji górnych dróg oddechowych, a zdarzeniami związanymi z narażeniem na zimną wodę. Podczas gdy krótkotrwała ekspozycja w zimnej wodzie może poprawić aktywność układu odpornościowego, powtarzana ekspozycja bez wystarczającej regeneracji i adaptacji może w rzeczywistości prowadzić do osłabienia funkcji odpornościowej. Częste pływanie lub długotrwałe zanurzenie w zimnej wodzie z uporczywymi dreszczami podczas i po pływaniu można zaliczyć do tej drugiej kategorii chronicznego stresu fizjologicznego [Dhabhar 2014]. W badaniu Loria i wsp. [2014] stwierdzili, że regularnie pływający zimą ochotnicy wykazywali nieprawidłowe dzienne wahania stężenia kortyzolu. Ponadto Dhabhar [2014] stwierdził, że ten przedłużający się stres spowodowany przewlekłą ekspozycją na zimno może przyczyniać się do rozregulowania normalnego dobowego cyklu kortyzolu, przyczyniając się do potencjalnego tłumienia odpowiedzi immunologicznych. Ponadto, możliwym czynnikiem zwiększającym prawdopodobieństwo infekcji górnych dróg oddechowych może być oddychanie zimnym powietrzem i chłodzenie powierzchni ciała, co może prowadzić do skurczu oskrzeli i wzmożonego skurczu naczyń nosowych [Eccles i wsp. 2015]. Jest to szczególnie istotne, biorąc pod uwagę, że trening pływania w dużej mierze obejmuje przerywane rytmy oddechowe, przyczyniając się do przejściowych stanów niedotlenienia [Trincat i wsp. 2017]. Ponadto wykazano, że trening wysiłkowy powyżej 80% VO_{2max} przyczynia się do apoptozy limfocytów i zmniejszenia liczby krążących białych krwinek [Wang i wsp. 2005]. W połączeniu z zaburzonym dobowym rytmem kortyzolu, większym zużyciem tlenu i zwiększoną intensywnością treningu, możliwe jest, że nadmierna ekspozycja na zimno prowadzi do utrzymującego się stresu fizjologicznego, a to może prowadzić do immunosupresji. Wśród wymienionych potencjalnych korzyści lub zagrożeń należy również uwzględnić indywidualne różnice w odpowiedzi fizjologicznej organizmu na stres jakim jest niska temperatura. Jednakże pływający w lodowatej wodzie, poprzez systematyczne narażenie na środowisko zimnej wody, są w stanie osiągnąć różne stopnie adaptacji do zimna. Tym samym jako forma ćwiczeń wytrzymałościowych pływanie w zimnej wodzie może zwiększyć tolerancję na czynniki stresowe [Siems i wsp. 1994]. Wykazano, że u pływaków zimowych intensywna, krótkotrwała ekspozycja całego ciała na zimno wywoływała stres oksydacyjny. Przedwysiłkowa aktywność enzymów kluczowych dla ochrony antyoksydacyjnej - dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy była wyższa w grupie pływaków niż w grupie kontrolnej [Siems i wsp. 1994]. Wyniki niektórych badań wskazują, że pływanie w zimnej wodzie praktykowane

przez osoby o dobrym ogólnym stanie zdrowia w trybie regularnym, stopniowanym (dostosowanym do pory roku) i spersonalizowanym, mogą przynosić korzyści zdrowotne [Kolettis i wsp. 2003, Manolis i wsp. 2019]. Z drugiej strony istnieje nawet ryzyko zgonu w przypadku nieodpowiednich zachowań z powodu początkowej neurogennej reakcji na szok termiczny, z powodu postępującego spadku wydajności pływania lub postępującej hipotermii [Kolettis i wsp. 2003].

Zastosowany w prezentowanej pracy model badawczy został wcześniej wykorzystany w pracy Lubkowska i wsp. [2019]. Autorzy badań wykazali wpływ treningu pływackiego w zimnej wodzie i temperaturze komfortu cieplnego na zmianę masy ciała badanych szczurów w zależności od płci. U samców szczurów pod wpływem wysiłku fizycznego w wodzie o niskiej temperaturze wykazano spadek masy ciała w porównaniu do wartości sprzed rozpoczęcia badań, co jak sugerują autorzy, wiązało się ze zwiększonym wydatkiem energetycznym na procesy związane z termoregulacją. U samic pływających w zimnej wodzie zaobserwowano spadek masy ciała jedynie przez pierwsze dwa tygodnie trwania eksperymentu, a następnie jej wzrost aż do zakończenia treningów, z końcową masą ciała zwierząt porównywalną do wyjściowej. Natomiast w przypadku treningu pływackiego w temperaturze komfortu cieplnego, zaobserwowano zmniejszenie masy ciała u samców i samic, które wynikało wyłącznie z wysiłku fizycznego. Ponieważ prezentowane badania są kontynuacją badań w/w autorów i zostały wykonane na dostępnych tkankach pochodzących od szczurów z cytowanego eksperymentu, mogą one dostarczyć cennych danych do analizy wpływu treningu pływackiego w zimnej wodzie na metabolizm energetyczny mięśni, szczególnie w kontekście starzenia. Krótkotrwała ekspozycja na niskie temperatury jest stosowana jako zabieg przeciwdziałający starzeniu się. Wpływ zimna na organizm jako czynnika profilaktyki wymaga jednak prowadzenia bardziej szczegółowych badań, szczególnie u osób starszych. Dotychczas wykazano, że podczas ekspozycji na zimno dochodzi do znaczącego obniżenia temperatury powierzchni ciała, warstwy podskórnej oraz mięśni, co powoduje, poprzez reakcję współczulną, wazokonstrykcję naczyń krwionośnych zmniejszając obrzęk i stan zapalny. Działanie to ogranicza uszkodzenia tkanek i wpływa korzystnie na regenerację w szczególności mięśni i nerwów [Konarzewski i wsp. 1994]. Długotrwała ekspozycja organizmu na zimno skutkuje wzrostem produkcji ciepła poprzez termogenezę drżeniową i bezdrżeniową oraz zwiększa tolerancję na zimno. U ssaków termogeneza drżeniowa, we wczesnej odpowiedzi na niskie temperatury, osiągnana jest poprzez zwiększenie aktywności mięśni szkieletowych [Konarzewski i wsp. 1994].

Wytwarzanie ciepła przez mięśnie zwiększa tempo przemiany materii i zużycie tlenu w aktywnie metabolicznych tkankach.

Wyniki badań Dudzinskiej i Lubkowskiej [2021] nad wpływem jednorazowej ekspozycji na zimno stosowane ogólnoustrojowo, na przemiany energetyczne i metabolizm nukleotydów purynowych w erytrocytach, potwierdziły, że pojedynczy zabieg w temperaturze -130°C prowadzi do zmian związanych z przemianami energetycznymi w obrębie krwinek czerwonych. Zmiany te są korzystne z punktu widzenia bioenergetyki komórki, wiążą się bowiem z następowym wzrostem wewnątrzerytrocytarnego stężenia ATP oraz AEC krwinek. Ponadto, odpowiedź metaboliczna puryn na temperatury kriogeniczne wiąże się również ze spadkiem stężenia produktów katabolizmu puryn, tj. inozyny i hipoksantyny we krwi. Oznaczać to może, że wzrost stężenia ATP w krwinkach czerwonych obok spadku stężenia inozyny i hipoksantyny w osoczu daje mocne podstawy do postawienia hipotezy o wzroście zasobów energetycznych również w innych komórkach.

W przeprowadzonych badaniach własnych powtarzana przez okres 8 tygodni, codzienna aktywność pływacka zwierząt w zimnej wodzie spowodowała również zwiększenie produkcji ATP, poprawiła parametry stanu energetycznego i korzystnie wpłynęła na dynamikę mitochondriów w mięśniach szkieletowych starzejących się szczurów. Stąd też można przypuszczać, że powtarzająca się ekspozycja na zimno może być czynnikiem prowadzącym do wystąpienia zmian o charakterze adaptacyjnym, wpływających na stan ogólny organizmu oraz opóźniającym starzenie się. Wyniki badań Hoffman-Goetz i wsp. 1986, sugerują, że wysiłek fizyczny w warunkach narażenia na zimno może zwiększyć tolerancję na zimno u starzejących się myszy, jednak nie wiadomo czy to działanie może wpłynąć na opóźnienie starzenia się. Stwierdzono natomiast, że wysiłek fizyczny zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę oraz wspomaga termogenezę w brunatnej tkance tłuszczowej u starzejących się szczurów [Mondon i wsp. 1990]. Dlatego też można przypuszczać, że zwiększona insulinooporność może zaburzać termogenezę, natomiast wysiłek fizyczny zmniejszając oporność organizmu na insulinę może poprawić jego tolerancję na zimno [Mercer i wsp. 1984]. Arnold i wsp. 1987 wysunęli hipotezę, że wytwarzanie większej ilości energii w postaci ciepła poprzez zwiększenie tempa metabolizmu u szczurów poddanych wysiłkowi fizycznemu w zimnym środowisku jest wystarczające, aby skompensować wpływ stresogennego czynnika jakim jest zimno, bez uruchamiania procesu termogenezы bezdrzeniowej w brunatnej tkance tłuszczowej. Obserwowany w prezentowanych badaniach wzrost stężenia ATP, poprawa parametrów energetycznych (wartości AEC, TAN) i nasiloną

biogeneza mitochondriów w mięśniach szkieletowych starzejących się szczurów poddanych treningowi pływackiemu w zimnej wodzie mogą wspierać ten pogląd.

Biogeneza mitochondriów i metabolizm energetyczny

Wysiłek fizyczny wywołuje wzrost obrotu energii mięśniowej i zapotrzebowania na tlen stanowiąc wyzwanie dla homeostazy organizmu [Hawley i wsp. 2014]. Zdolność mięśni szkieletowych do przystosowania się do powtarzających się okresów aktywności, które zwiększają wydolność fizyczną, określana jest jako tolerancję wysiłkową. Rozważając wysiłki wytrzymałościowe (np. długotrwałe ćwiczenia trwające powyżej 10 minut i wykonywane przy 60% -90% maksymalnego poboru tlenu [VO_{2max}]) celem takich ćwiczeń jest wywołanie szeregu fizjologicznych i metabolicznych zmian adaptacyjnych, które umożliwiają zwiększenie tempa produkcji energii na szlakach oksydacyjnych, utrzymanie ściślejszej kontroli metabolicznej (tj. dopasowanie produkcji ATP do jego hydrolizy, minimalizowanie zaburzeń homeostazy komórkowej i ograniczenie skutków tych zaburzeń, poprawa wydajności i efektywności pracy mechanicznej mięśni, czy zwiększenia oporności na zmęczenie [Hawley i wsp. 2002]. Mechanizmy, za pomocą których aktywne mięśnie wykrywają zaburzenia homeostatyczne, a następnie przekładają je na poprawę funkcji, były przedmiotem intensywnych badań od wielu dekad. Obecnie uznaje się, że na początku wysiłku ma miejsce szereg zaburzeń komórkowych, w tym m.in. zwiększenie stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} , AMP i zwiększenie stosunku ADP/ATP, zmniejszony poziom fosforanu kreatyny i glikogenu, zwiększone stężenie kwasów tłuszczowych, zwiększone stężenie ROS i NOS, kwasica, zwiększony stosunek NAD/ NADH [Hawley i wsp. 2014].

W aspekcie homeostazy metabolicznej stymulowany jest szereg czynników regulacyjnych, które utrzymują tempo syntezy ATP poprzez aktywację enzymów kontrolujących kluczowe etapy katabolizmu węglowodanów i lipidów. Wciąż otwarte pozostaje pytanie w jaki sposób gwałtowne zakłócenie sygnałów komórkowych, które utrzymują dopływ energii, stymuluje również długoterminowe procesy adaptacyjne, które poprawiają pracę mięśni. Kluczowym elementem poprawy sprawności mięśni w odpowiedzi na trening wysiłkowy jest biogeneza mitochondriów, złożony proces, który wymaga koordynacji wielu mechanizmów, w tym uruchomienia transkrypcji genów, syntezy lipidów i białek oraz skoordynowanego „składania” kompleksów białkowych w funkcjonalny łańcuch oddechowy [Hood 2001]. Te złożone procesy skutkują zwiększeniem całkowitej ilości mitochondriów w obrębie mięśni i zwiększeniem sieci mitochondrialnej, co poprawia zdolność komórki do dopasowania produkcji i hydrolizy ATP, minimalizując w ten sposób

zaburzenia komórkowej homeostazy, które wystąpiły w początkowej fazie wysiłku mięśniowego. Już w roku 1967 Holloszy postawił hipotezę o istotnej korelacji między zdolnością mięśnia do wykonywania długotrwałego submaksymalnego wysiłku i aktywnością enzymów oddechowych oraz że obserwowane różnice w sprawności mięśni mogą być wynikiem procesu adaptacyjnego. Aby przetestować tę hipotezę, szczury poddano intensywnemu treningowi biegania na bieżni i wykazano, że doprowadziło to do wzrostu aktywności enzymów mitochondrialnych mięśni szkieletowych [Holloszy 1967]. Mitochondria mięśniowe pochodzące od zwierząt wytrenowanych wykazywały wyższy poziom kontroli oddechowej i ściśle sprzężoną fosforylację oksydacyjną w porównaniu do mitochondriów pochodzących od zwierząt niewytrenowanych. Wzrost zdolności transportu elektronów był powiązany z jednoczesnym wzrostem zdolności do produkcji ATP i był odpowiedzialny za wydłużenie czasu aktywności biegowej u wytrenowanych zwierząt. Kluczową cechą w protokole treningu fizycznego było zastosowanie intensywnego wysiłku o charakterze interwałowym, opartym na założeniu, że każdy cykl ćwiczeń musi przekroczyć minimalny „bodziec progowy”, aby wywołać metaboliczne i morfologiczne zmiany adaptacyjne w mięśniach. Reżim treningowy, którego pionierem był Holloszy, może być postrzegany jako prekursor obecnych protokołów treningu „*sprint-intensity interval training*”, obecnie powszechnie akceptowanych jako silny bodziec do fizjologicznej przebudowy mięśni [Parra i wsp. 2000; Rodas i wsp. 2000; Perry i wsp. 2007; MacInnis i wsp. 2017]. Prace Holloszy [1967, 1976] wykazały, że mięśnie szkieletowe wykazują zdolność do zmiany zarówno rodzaju jak i ilości białka w odpowiedzi na zaburzenia homeostazy komórkowej wywołane przez ich aktywność. Wyniki tych badań dały także początek badaniom na zwierzętach pokazujących, że wzrost aktywności enzymów mitochondrialnych w mięśniach po kilku tygodniach treningu wysiłkowego był związany z większą liczbą i rozmiarem mitochondriów oraz z gęstszym upakowaniem grzebieni mitochondrialnych [Gollnick i wsp. 1969]. Kluczowe stało się odkrycie faktu, że zwiększonej aktywności enzymów mitochondrialnych po treningu nie towarzyszył wzrost aktywności cytozolowych enzymów kinazy kreatynowej i kinazy adenylanowej, co uwiarygodniło hipotezę o zwiększeniu syntezy ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej w wytrenowanych mięśniach [Oscari i wsp. 1971]. Późniejsze badania potwierdziły trafność tej hipotezy. Długotrwały trening fizyczny [Varnauskas i wsp. 1970] i porównanie wytrenowanych i niewytrenowanych mężczyzn ujawniły wyższą maksymalną aktywność enzymów mitochondrialnych w próbkach pobranych z mięśnia czworogłowego uda [Booth i wsp. 1974] i większą liczbę mitochondriów zobrazowanych w oparciu o techniki mikroskopii elektronowej [Hoppeler i wsp. 1973]. W dalszych badaniach

wykazano, że trening wytrzymałościowy zwiększał zawartość mitochondriów, aktywność enzymów mitochondrialnych i VO_{2max} , ale te parametry były niższe u osób starszych [Kiessling i wsp. 1974]. Obserwacje te po raz pierwszy sugerowały, że „plastyczność” mięśnia może być zmniejszona wraz ze starzeniem się organizmu. Odkrycia te przyczyniły się do stwierdzenia, że wydolność tlenowa jest ograniczona nie tylko przez czynniki warunkujące pokrycie zapotrzebowania na tlen (tj. czynniki krążeniowo-oddechowe), ale także przez liczbę mitochondriów mięśni szkieletowych, zgodnie z funkcją pracującego mięśnia jako końcowego odbiorcy tlenu podczas produkcji ATP.

Kontynuowanie badań na gryzoniach pozwoliło na opracowanie modelu badań pokazującego związek między ilością mitochondriów a kontrolą metaboliczną w mięśniach szkieletowych podczas wysiłku fizycznego. Model ten zakładał, że większa liczba mitochondriów poprawia wrażliwość oksydacyjną na ADP, przy czym szybkość tlenowej produkcji ATP, niezbędna do wspomaganie skurczu mięśni, wymagałaby mniejszego wzrostu ADP na początku wysiłku spowodowanego większą liczbą mitochondriów [Holloşy i wsp. 1984]. W badaniach ludzkich mięśni szkieletowych stwierdzono także, że zwiększone zużycie tlenu na początku intensywnego wysiłku może zostać obniżone przez trening wysiłkowy, obniżając stężenie inhibitorów fosforylacji oksydacyjnej, co skutkowałoby mniejszą stymulacją glikolizy i większym udziałem energii pochodzącej z utleniania kwasów tłuszczowych [Gollnick i wsp. 1982]. Ta hipoteza została zweryfikowana w badaniach, w których porównano mięśnie szkieletowe wytrenowanych i niewytrenowanych szczurów i wykazano, że indukowany treningiem wzrost maksymalnej aktywności oksydazy cytochromu c (świadczącej o zwiększonej ilości mitochondriów) był związany z mniejszym wzrostem stężenia ADP podczas ostrego skurczu mięśni, mniejszym stężeniem fosfokreatyny i obniżeniem przemian ATP do AMP i IMP, a także zmniejszeniem tempa glikolizy [Dudley i wsp. 1987]. W wielu innych badaniach wykazano związek między poprawą zdolności oksydacyjnej mitochondriów a intensywnością treningu pomimo złożoności odpowiedzi wywołanej treningiem wysiłkowym, w dużej mierze wynikającej z protokołów treningowych o różnej intensywności i czasie trwania oraz różnych typach badanych mięśni [Dudley i wsp. 1982]. Wyniki tych badań zainicjowały podjęcie kolejnych, nad sygnałami komórkowymi generowanymi podczas wysiłku fizycznego i skutkiem ich działania w postaci indukowanej treningiem większej ilości mitochondriów. Dopiero pod koniec lat osiemdziesiątych XX wieku wykazano, że wysiłek fizyczny stymuluje ekspresję genów jądrowych, które kodują białka mitochondrialne, ale szlaki sygnalizacyjne i regulatory ekspresji genów pozostawały

wciąż nieznane. Jednym z pierwszych badań przeprowadzonych w celu wskazania molekularnych mechanizmów zwiększenia ilości białek mitochondrialnych skutkiem skurczów mięśni, było badanie Williams i wsp. [1986], którzy stwierdzili wyższą ekspresję mRNA cytochromu b, a także zwiększoną aktywność syntazy cytrynianowej i stężenia mitochondrialnego DNA (jako markerów ilości mitochondriów) po przewlekłej elektrycznej stymulacji mięśnia piszczelowego przedniego królika [Williams i wsp. 1986]. W późniejszych badaniach wykazano, że różne rodziny białek mitochondrialnych są regulowane przez czynniki transkrypcyjne, wśród których kluczową rolę odgrywa PGC-1 α regulujące skoordynowaną ekspresję białek mitochondrialnych i współdziałający z receptorem PPAR γ w regulacji ekspresji wielu różnych genów [Scarpulla 2002, Lin i wsp. 2005, Scarpulla 2006]. Dotychczas opisano dwa strukturalne homologii PGC-1 α : PGC-1 β i PGC (PGC-1 – Related Coactivator), które tworzą rodzinę białek PGC-1 [Villena i wsp. 2015]. Do indukcji białka PGC-1 α dochodzi głównie w momencie zwiększonego zapotrzebowania tlenowego tkanki m.in. przy zwiększonym wysiłku fizycznym w mięśniach szkieletowych [Tiraby i wsp. 2003] i ekspozycji na zimno w brunatnej tkance tłuszczowej [Sadana i wsp. 2007].

Również w prezentowanych badaniach własnych wykazano, że ekspresja białka i mRNA PGC-1 α w mięśniach samców i samic szczurów pływających w zimnej wodzie była istotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie samców i samic pływających w warunkach komfortu cieplnego stwierdzono także tendencje wzrostu ekspresji mRNA i białka PGC-1 α , jednakże zmiana ta był statystycznie nieistotna. W badaniach innych autorów także wykazano, że już pojedyncza sesja ćwiczeń wytrzymałościowych wywołuje wzrost ekspresji mRNA i białka PGC-1 α zarówno u gryzoni [Meirhaeghe i wsp. 2003, Koves i wsp. 2005] jak i w mięśniach szkieletowych człowieka [Watt i wsp. 2004, Mortensen i wsp. 2007, Edgett i wsp. 2013]. Egan i wsp. 2010 zaobserwowali wzrost ekspresji mRNA PGC-1 α w mięśniach szkieletowych u osób wcześniej nietrenujących, które zostały poddane krótkim treningom o wysokiej intensywności w porównaniu do dłuższych treningów, ale o niskiej intensywności. Również w badaniach Edgett i wsp. [2013] zaobserwowano wzrost ekspresji mRNA PGC-1 α w mięśniach oraz zwiększoną fosforylację kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK), kinazy białkowej zależnej od Ca²⁺ / kalmoduliny (CaMK) II i kinazy białkowej aktywowanej mitogenem p38 (p38 MAPK) [Akimoto i wsp. 2005]. Wykazano, że również trening wytrzymałościowy zwiększał ekspresję mRNA i białka PGC-1 α w mięśniach szkieletowych gryzoni i człowieka [Kuhl i wsp. 2006, Perry i wsp. 2007, 2010, Granata i wsp. 2016]. Tym samym wykazano, że jednym z czynników indukujących PGC-1 α w komórkach mięśni szkieletowych jest aktywność fizyczna oraz jednocześnie, że ma on wpływ na metabolizm mięśniowy podczas wysiłku

poprzez zwiększenie magazynu mięśniowego glikogenu oraz regulację jego wykorzystania podczas pracy mięśni. Stwierdzono także, że związane jest to ściśle z przyspieszeniem dokomórkowego transportu glukozy i mleczanu przez zmianę aktywności białek transportowych GLUT4 i MCT1 (transporter monokarboksylanów 1) [Bonen i wsp. 2009]. W badaniach na szczurach udowodniono, że PGC-1 α stymuluje ekspresję genu kinazy pirogronianowej 4 (PDK4), którego białkowy produkt hamuje aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej uczestniczącej w reakcji przekształcania pirogronianu do acetylo-CoA [Song i wsp. 2010, Zhang i wsp. 2014a] oraz acylotransferazy karnitynowej I (CPT1), która bierze udział w oksydacji kwasów tłuszczowych [Attia i wsp. 2010]. PGC-1 α może pełnić istotną rolę w przemianach energetycznych w mięśniach, przyczynia się bowiem do przyspieszenia procesu ich utleniania poprzez indukcję CPT1. Ponadto PGC-1 α pełni rolę czynnika transkrypcyjnego dla regulatorowych enzymów glukoneogenezy: kinazy fosfoenolpirogronianowej oraz glukozy-6-fosfatazy. PGC-1 α kontroluje proces glukoneogenezy także poprzez inhibicję kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej, zapewniając tym samym odpowiedni poziom pirogronianu jako substratu do syntezy glukozy [Attia i wsp. 2010]. PGC-1 α pełni kluczową rolę w procesach regulacji metabolizmu tlenowego, wpływając na biogenezę mitochondriów poprzez oddziaływanie m.in. na czynniki transkrypcyjne NRF-1 i NRF-2 (*Nuclear Respiratory Factor 1/2*). PGC-1 α wiąże się z NRF-1 i transaktywuje jego geny docelowe. Powstałe białka biorą udział w oddychaniu mitochondrialnym [Huss i wsp. 2004]. Wykazano również, że ekspozycja na niskie temperatury prowadzi do indukcji PGC-1 α , które następnie stymuluje ekspresję mitochondrialnych białek rozprzegających biorących udział w procesie adaptacji komórek do niskich temperatur oraz w termogenezie w miocytach [Ueda i wsp. 2005].

Wykazano dotychczas, że wzrost ekspresji białka PGC-1 α w mięśniach podczas treningu fizycznego jest związany z faktem, że autoreguje on swój własny promotor poprzez ang. *Myocyte Enhancer Factor 2* (MEF2) [Handschin i wsp. 2003]. W warunkach zimna ekspresja PGC-1 α jest także pobudzana przez wzrost stężenia cAMP [Daitoku i wsp. 2003]. Skutkiem wzrostu stężenia noradrenaliny w tych warunkach dochodzi do aktywacji cyklicznej adenylowej i w konsekwencji wzrostu stężenia cAMP. Cykliczny AMP poprzez aktywację kinazy białkowej A (PKA) aktywuje jeden z czynników transkrypcyjnych PGC-1 α tj. białko CREB (*cAMP Response Element-Binding*). Promotor genu PGC-1 α zawiera w swojej budowie obszar CRE (*cAMP Response Element*), z którym wiąże się CREB [Daitoku i wsp. 2003]. W ten sposób dochodzi do indukcji PGC-1 α [Novotna i wsp. 2013].

Stwierdzono, że czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym istotną rolę w indukowanej wysiłkiem biogenezie mitochondriów w mięśniach szkieletowych może być również białko supresorowe nowotworu p53 (*ang. Tumor Suppressor Protein p53*). Białko to jest przypuszczalnie aktywowane przez AMPK i / lub p38 MAPK. Wykazano, że myszy z nokautem p53 wykazywały zmniejszoną wytrzymałość w porównaniu z myszami typu dzikiego, zmniejszoną ilość mitochondriów, zmniejszoną ekspresję PGC-1 α oraz brak transkryptów mRNA związanych z biogenezą mitochondriów po wysiłku [Saleem i wsp. 2014].

Wykazano, że również AMPK indukuje biogenezę mitochondriów poprzez bezpośrednią fosforylację i aktywację PGC-1 α [Winder i wsp. 2000]. AMPK jest członkiem rodziny kinaz białkowych, która działa jako metaboliczny „wskaźnik paliwa” w mięśniach szkieletowych, składający się z podjednostek regulatorowych α , β , γ , które istnieją w wielu izoformach i są wymagane do pełnej aktywności enzymatycznej. Wykazano, że AMPK została zaktywowana w odpowiedzi na wywołane wysiłkiem podwyższenie poziomu AMP [Winder i wsp. 2000] oraz że aktywacja AMPK była zależna od intensywności wysiłku [Wadley i wsp. 2006]. Dowodów na potwierdzenie tej hipotezy dostarczyły badania pokazujące, że szybka i przejściowa aktywacja AMPK po intensywnych ćwiczeniach jest związana z gwałtownym wzrostem stężenia AMP w mięśniach [McConell i wsp. 2005]. Po okresie treningu obserwowano niższe stężenia AMP i słabszą aktywacja AMPK podczas ćwiczeń wykonywanych przy tej samej bezwzględnej (przedtreningowej) szybkości pracy mięśni, co może częściowo wyjaśniać, dlaczego biogeneza mitochondriów zwalnia i ostatecznie osiąga stan równowagi [McConell i wsp. 2005].

W prezentowanych badaniach własnych zaobserwowano natomiast spadek stężenia AMP w mięśniach starzejących się szczurów poddanych treningowi w zimnej wodzie i pływających w wodzie o temp. komfortu cieplnego oraz wzrost ekspresji mRNA i białka PGC-1 α w mięśniach szczurów trenujących w zimnej wodzie. Stężenie AMP było najniższe w warunkach pływania w zimnej wodzie, co może wskazywać na osiągnięcie stanu równowagi biogenezy mitochondrialnej w wyniku procesu adaptacji. Zwiększona ilość mitochondriów przekładać się może na wzrost stężenia ATP i wartości ładunku energetycznego (AEC) mięśni obserwowany w prezentowanych badaniach, szczególnie w warunkach treningu w zimnej wodzie.

Obserwowany w prezentowanych badaniach istotny wzrost ekspresji mRNA i białka PGC-1 α w mięśniach szczurów trenujących w zimnej wodzie w odróżnieniu od nieistotnego wzrostu ekspresji w mięśniach szczurów trenujących w ciepłej wodzie wynikać może z faktu, że wzrost ilości mitochondriów wywołany wysiłkiem fizycznym jest wynikiem skumulowanych oddziaływań powtarzającego się, ale przejściowego wzrostu ekspresji mRNA kodującego białka mitochondrialne, którego ekspresja zwiększyła się w okresie odpoczynku, po kolejnych i addytywnych treningach wysiłkowych [Pilegaard i wsp. 2000]. Wyniki prezentowanych badań wskazują ponadto, że w treningu pływackim w zimnej wodzie, w przypadku szlaków związanych z biogenezą mitochondriów, możliwa jest kompensacyjna regulacja w górę wielu ścieżek sygnałowych indukowanych wysiłkiem i temperaturą, które mogą brać udział w biogenezie mitochondriów.

Obserwowany w prezentowanych badaniach wzrost ekspresji Mfn1, Mfn 2 oraz Opa1 i Drp1 świadczyć może o nasilonych procesach fuzji i fragmentacji, a tym samym o zwiększonej dynamice mitochondriów w mięśniach. Można przypuszczać, że zwiększone zapotrzebowanie na energię metaboliczną może wpływać na tworzenie sieci mitochondriów, co może mieć miejsce przy ekspozycji komórek na zimno oraz że proces ten optymalizuje ich funkcje w tych stresowych warunkach. Zwiększona dynamika mitochondriów stanowić może adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych, wpływając również korzystnie na utrzymanie bioenergetycznej wydolności w dłuższym czasie. W starzejących mięśniach proces ten może również wpłynąć na kompensację nagromadzenia mutacji mitochondrialnych i tym samym poprawiać stan metaboliczny mięśni oraz wpłynąć na zwiększenie syntezy ATP, co zaobserwowano w prezentowanych badaniach.

7. WNIOSKI

1. Wysiłek fizyczny w zimnej wodzie może wywierać pozytywny wpływ na metabolizm energetyczny, biogenezę i dynamikę (procesy łączenia i fragmentacji) mitochondriów starzejących się mięśni szczurów.
2. Nasilenie dynamiki mitochondriów w warunkach wysiłku fizycznego w zimnej wodzie może poprawiać funkcje mitochondriów i optymalizować ich zdolności bioenergetyczne w starzejących się mięśniach szczura.
3. Zmiany stężenia związków wysokoenergetycznych i ekspresji białek regulujących dynamikę mitochondriów w mięśniach mogą być przydatnym wskaźnikiem w monitorowaniu zmian adaptacyjnych zachodzących w starzejących się mięśniach pod wpływem wysiłku fizycznego w zimnej wodzie.

8. STRESZCZENIE

Ekspozycja na niskie temperatury może być rozpatrywana jako czynnik stresogenny, który może prowadzić do reakcji adaptacyjnych. Można przypuszczać, że zimno może być czynnikiem pozytywnie modyfikującym proces starzenia się mięśni poprzez usprawnienie mechanizmów związanych z biogenezą mitochondriów i syntezą ATP, po uwzględnieniu przeciwwskazań, indywidualnego dostosowania temperatury, czasu trwania, formy ekspozycji oraz płci. Biorąc powyższe pod uwagę w niniejszej pracy postawiono hipotezę o możliwości pozytywnego wpływu wysiłku fizycznego w zimnej wodzie na biogenezę mitochondriów i metabolizm energetyczny mięśni starzejących się szczurów. Celem pracy była (1) ocena wpływu wysiłku fizycznego w zimnej wodzie na parametry stanu energetycznego, zawartość związków purynowych i biogenezę mitochondriów w mięśniach starzejących się szczurów (2) ocena zmian stężenia związków wysokoenergetycznych i zmian ekspresji białek regulujących dynamikę mitochondriów w mięśniach, jako wskaźników wpływu wysiłku fizycznego w zimnej wodzie i ich przydatności w monitorowaniu zmian adaptacyjnych. Cele szczegółowe obejmowały: oznaczenie stężenia ATP (adenozyno-5'-trifosforanu); ADP (adenozyno-5'-difosforanu); AMP (adenozyno-5'-monofosforanu); Ado (adenozyny); wartości potencjału energetycznego adenylanów (AEC); wartości puli nukleotydów adenylowych (TAN) oraz ekspresji mRNA i białka koaktywatora 1α receptora γ aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PGC- 1α); ekspresji mRNA mitofuzyny 1 (Mfn1); mitofuzyny 2 (Mfn2); ekspresji mRNA Opa1; ekspresji mRNA Drp1 w mięśniach szkieletowych starzejących się szczurów poddanych treningowi fizycznemu w zimnej wodzie. Badania przeprowadzono na 64 osobnikach starzejących się szczurów obu płci stada niekrewniaczego Wistar (32 samców i 32 samic), będących w chwili rozpoczęcia doświadczenia w wieku 15 miesięcy. Badania zostały przeprowadzone za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Szczecinie (Uchwała nr: 4/2014). Szczury losowo przydzielono do grup badawczych: Grupy kontrolne (n = 16 osobników): zwierzęta przebywające w warunkach sedenteryjnych - Grupa kontrolna samce (n = 8), Grupa kontrolna samice (n = 8); Grupy badane 5°C (n = 24 osobniki): zwierzęta wykonujące trening pływacki w zimnej wodzie o temperaturze 5°C \pm 2°C - Grupa 5°C samce (n = 12), Grupa 5°C samice (n = 12); Grupy badane 36°C (n = 24 osobniki): zwierzęta poddane treningowi pływackiemu w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego (36°C \pm 2°C) - Grupa 36°C samce (n = 12), Grupa 36°C samice (n = 12). Zwierzęta w przeprowadzonym doświadczeniu były

poddawane treningowi pływackiemu przez 9 tygodni. Podczas pierwszego tygodnia badań czas trwania pierwszego treningu pływackiego wynosił 2 minuty (pierwszego dnia) i był wydłużany dziennie o 0,5 minuty, aż do osiągnięcia czasu treningu wynoszącego 4 minuty (w piątym dniu pierwszego tygodnia). Od drugiego do ósmego tygodnia czas treningu pływackiego zwierząt wynosił 4 minuty dziennie. Treningi prowadzono codziennie przez 5 dni w tygodniu. Po zakończeniu badań, czterdzieści osiem godzin po ostatnim treningu pływackim przeprowadzono sekcję zwierząt. W tkance mięśni szkieletowych uda szczurów wykonano badania stężenia ATP, ADP, AMP, Ado (metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej HPLC), ekspresji białka PGC-1 α (metodą Western blot), ekspresji genów *PGC1A*, *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*, *Drp1* metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z obrazowaniem w czasie rzeczywistym (qRT PCR). Przeprowadzone badania wykazały, że pływanie w wodzie o temperaturze komfortu cieplnego wpłynęło na poprawę metabolizmu energetycznego mięśni starzejących się szczurów poprzez zwiększenie tempa metabolizmu (wyrażone jako zwiększenie stężenia ATP, ADP, TAN, AEC) oraz nasilenie fuzji mitochondrialnej (wyrażone jako zwiększenie ekspresji mRNA białek regulujących *Mfn1*, *Mfn2*). Pływanie w zimnej wodzie wpłynęło na poprawę metabolizmu energetycznego mięśni starzejących się szczurów poprzez zwiększenie tempa metabolizmu energetycznego mięśni (wyrażone jako zwiększenie stężenia ATP, ADP, TAN, AEC) oraz nasilenie biogenezy i dynamiki mitochondriów (wyrażone jako zwiększenie ekspresji mRNA białek czynników regulujących fuzję *Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1* oraz fizję mitochondriów *Drp1*). Stężenie związków wysokoenergetycznych i ekspresja białek regulujących dynamikę mitochondriów w mięśniach mogą być przydatnym wskaźnikiem w monitorowaniu zmian adaptacyjnych zachodzących w starzejących się mięśniach pod wpływem wysiłku fizycznego w zimnej wodzie. Można przypuszczać, że fuzja jest niezbędna do optymalizacji funkcji mitochondriów, aby umożliwić komórkom mięśniowym sprostać zwiększonemu zapotrzebowaniu na energię podczas wysiłku fizycznego w zimnej wodzie. Stanowi krótkoterminową adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych oraz wpływa korzystnie na utrzymanie bioenergetycznej wydolności mięśni w dłuższym czasie.

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

1. Wysiłek fizyczny w zimnej wodzie może wywierać pozytywny wpływ na metabolizm energetyczny, biogenezę i dynamikę (procesy łączenia i fragmentacji) mitochondriów starzejących się mięśni szczurów.

2. Nasilenie dynamiki mitochondriów w warunkach wysiłku fizycznego w zimnej wodzie może poprawiać funkcje mitochondriów i optymalizować ich zdolności bioenergetyczne w starzejących się mięśniach szczura.

3. Zmiany stężenia związków wysokoenergetycznych i ekspresji białek regulujących dynamikę mitochondriów w mięśniach mogą być przydatnym wskaźnikiem w monitorowaniu zmian adaptacyjnych zachodzących w starzejących się mięśniach pod wpływem wysiłku fizycznego w zimnej wodzie.

9. SUMMARY

Exposure to cold temperatures can be considered a stressor that can lead to adaptive responses. It can be hypothesized that cold is a factor that positively modifies muscle aging by improving mechanisms related to mitochondrial biogenesis and ATP synthesis, after taking into account the contraindications, individual adjustment to temperature, duration and form of exposure, and gender. Taking the above into account, the present study hypothesized the possibility of a positive effect of cold water exercise on mitochondrial biogenesis and muscle energy metabolism in aging rats. The purpose of this study were; (1) to evaluate the effects of cold water exercise on energy status, purine compounds, and mitochondrial biogenesis in the muscles of aging rats, (2) to assess changes in the concentration of high-energy compounds and changes in the expression of proteins that regulate mitochondrial dynamics in muscles, as indicators of the effects of cold water exercise and their usefulness in monitoring adaptive changes. Specific objectives included the determination of ATP (adenosine 5'-triphosphate); ADP (adenosine 5'-diphosphate); AMP (adenosine 5'-monophore); Ado (adenosine); adenylate energy potential (AEC) values; adenyl nucleotide pool (TAN) values; and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PGC-1 α) mRNA and protein expression; mRNA expression of mitofusin 1 (Mfn1); mitofusin 2 (Mfn2); mRNA expression of Opa1; and mRNA expression of Drp1 in skeletal muscles of aging rats subjected to physical training in cold water. The study was conducted on 64 aging rats of both sexes of Wistar non-breeding stock (32 males and 32 females), 15 months old at the time of the experiment. The rats were randomly assigned to the following study groups: control (n = 16 individuals) sedentary animals - control males (n = 8), control females (n = 8); 5°C groups (n = 24 individuals) animals training swimming in cold water at 5°C \pm 2°C : 5°C males (n = 12), 5°C females (n = 12); 36°C groups (n = 24 individuals) animals training swimming in water at thermal comfort

temperature ($36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), 36°C males ($n = 12$), 36°C females ($n = 12$). The study was conducted with the approval of the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Szczecin (Resolution No: 4/2014). The animals in the experiment were subjected to swimming training for 9 weeks. During the first week of the study, the duration of the first swimming training was 2 minutes (on the first day), increasing daily by 0.5 minutes up to 4 minutes on the fifth day of the first week. From the second to the eighth week, the swimming training was 4 minutes per day, five days a week. At the end of the study, forty-eight hours after the last swim training, the animals were dissected. In the skeletal muscle tissue of the thighs of the rats, we determined the concentrations of ATP, ADP, AMP, Ado (by high-performance liquid chromatography HPLC), PGC-1 α protein expression (by Western blot), PGC1A, Mfn1, Mfn2, Opa1, and Drp1 gene expression using real-time polymerase chain reaction (qRT PCR). The study showed that swimming in water at a thermally comfortable temperature improved the energy metabolism of the aging rat muscles by increasing the metabolic rate (expressed as an increase in ATP, ADP, TAN, AEC) and enhancing mitochondrial fusion (expressed as an increase in mRNA expression of regulatory proteins Mfn1 and Mfn2). Cold water swimming improved muscle energy metabolism in aging rats by increasing the rate of muscle energy metabolism (expressed as an increase in ATP, ADP, TAN, AEC concentrations) and enhancing mitochondrial biogenesis and dynamics (expressed as an increase in the mRNA expression of proteins of fusion-regulating factors – Mfn1, Mfn2, and Opa1, and the factor regulating mitochondrial fission – Drp1). The concentration of high-energy compounds and the expression of proteins regulating mitochondrial dynamics in the muscle may be a useful indicator in monitoring adaptive changes occurring in aging muscles under the influence of exercise in cold water. It can be speculated that fusion is necessary to optimize mitochondrial function to enable muscle cells to meet increased energy demands during cold-water exercise. It represents a short-term adaptation to changing environmental conditions and has a beneficial effect on maintaining the bioenergetic capacity of muscles in the long term. This research allowed us to formulate the following conclusions: (1) Exercise in cold water can exert positive effects on energy metabolism, biogenesis and dynamics (fusion and fragmentation processes) of mitochondria in aging rat muscles (2) Enhancement of mitochondrial dynamics under cold water exercise conditions can improve mitochondrial function and optimize the bioenergetic capacity of mitochondria in aging rat muscles (3) Changes in the concentration of high-energy compounds and the expression of proteins that regulate mitochondrial dynamics in the muscle may be a useful indicator in monitoring adaptive changes occurring in aging muscles under cold water exercise.

10. PIŚMIENICTWO

1. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, Williams RS, Yan Z. Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem* 2005, 280, 19587-19593. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408862200>
2. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000, 26, 211-215. <https://doi.org/10.1038/79944>
3. Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Zorov DB. Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes. *J Cell Biol* 1988, 107, 481-495. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.2.481>
4. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, Langer T. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol* 2014, 204, 919-929. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308006>
5. Arnold J, Richard D. Exercise during intermittent cold exposure prevents acclimation to cold rats. *J Physiol* 1987, 390, 45-54. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016685>
6. Attia RR, Connaughton S, Boone LR, Wang F, Elam MB, Ness GC, Cook GA, Park EA. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) by thyroid hormone: role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator (PGC-1 α). *J Biol Chem* 2010, 285, 2375-2385. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.039081>
7. Baker MJ, Lampe PA, Stojanovski D, Korwitz A, Anand R, Tatsuta T, Langer T. Stress-induced OMA1 activation and autocatalytic turnover regulate OPA1-dependent mitochondrial dynamics. *EMBO J* 2014, 33, 578-593. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386474>
8. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005, 120, 483-495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>
9. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, Rossignol R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 2007, 120, 838-848. <https://doi.org/10.1242/jcs.03381>
10. Benard G, Karbowski M. Mitochondrial fusion and division: Regulation and role in cell viability. *Semin Cell Dev Biol* 2009, 20, 365-374. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2008.12.012>
11. Bartlett JD, Close GL, Drust B, Morton JP. The emerging role of p53 in exercise metabolism. *Sports Med* 2014, 44, 303-309. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0127-9>
12. Bertholet AM, Delerue T, Millet AM, Moulis MF, David C, Daloyau M, Arnauné-Pelloquin L, Davezac N, Mils V, Miquel MC, Rojo M, Belenguer P. Mitochondrial fusion/fission dynamics in neurodegeneration and neuronal plasticity. *Neurobiol Dis* 2016, 90, 3-19. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.011>
13. Boissan M, Montagnac G, Shen Q, Griparic L, Guitton J, Romao M, Sauvonnet N, Lagache T, Lascu I, Raposo G, Desbordes C, Schlattner U, Lacombe ML, Polo S, van der Bliek AM, Roux A, Chavrier P. Membrane trafficking. Nucleoside diphosphate

- kinases fuel dynamin superfamily proteins with GTP for membrane remodeling. *Science* 2014, 344, 1510-1515. <https://doi.org/10.1126/science.1253768>
13. Bonen A. PGC-1 α -induced improvements in skeletal muscle metabolism and insulin sensitivity. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009, 34, 307-314. <https://doi.org/10.1139/H09-008>
 14. Booth FW, Narahara KA. Vastus lateralis cytochrome oxidase activity and its relationship to maximal oxygen consumption in man. *Pflugers Arch* 1974, 349, 319-324. <https://doi.org/10.1007/BF00588417>
 15. Bottley KR. Winter wild swimming as individual and corporate spiritual practice. *Pract Theol* 2019, 12, 1-3. <https://doi.org/10.1080/1756073X.2019.1589731>
 16. Brazaitis M, Eimantas N, Daniuseviciute L, Mickeviciene D, Steponaviciute R, Skurvydas A. Two strategies for response to 14 °C cold-water immersion: is there a difference in the response of motor, cognitive, immune and stress markers? *PLoS One* 2014, 9, e109020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109020>
 17. Brenke R. Winter swimming—An extreme form of body hardening. *Therapeutikon* 1990, 4, 466-472.
 18. Brož P, Rajdl D, Racek J, Zeman V, Novák J, Trefil L. Relationship between cold water swimming and increased cardiac markers: A pilot study. *Klin Biochem Metab* 2017, 25, 27-31.
 19. Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet* 2006, 79, 469-480. <https://doi.org/10.1086/507132>
 20. Burnstock G. Introduction to Purinergic Signaling. *Methods Mol Biol* 2020, 2041, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1
 21. Cameron RB, Beeson CC, Schnellmann RG. Development of Therapeutics That Induce Mitochondrial Biogenesis for the Treatment of Acute and Chronic Degenerative Diseases. *J Med Chem* 2016, 59, 10411-10434. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00669>
 22. Cameron RB, Peterson YK, Beeson CC, Schnellmann RG. Structural and pharmacological basis for the induction of mitochondrial biogenesis by formoterol but not clenbuterol. *Sci Rep* 2017, 7, 10578. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11030-5>
 23. Campello S, Lacalle RA, Bettella M, Mañes S, Scorrano L, Viola A. Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J Exp Med* 2006, 203, 2879-2886. <https://doi.org/10.1084/jem.20061877>
 24. Carelli V, Chan DC. Mitochondrial DNA: impacting central and peripheral nervous systems. *Neuron* 2014, 84, 1126-1142. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.022>
 25. Carlucci A, Lignitto L, Feliciello A. Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol* 2008, 18, 604-613. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.09.006>
 26. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105, 15803-15808. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808249105>
 27. Cervený KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H. Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol* 2007, 17, 563-569. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.08.006>
 28. Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1201, 34-39. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05629.x>

29. Chang CR, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 2007, 282, 21583-21587. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700083200>
30. Checinska-Maciejewska Z, Miller-Kasprzak E, Checinska A, Korek E, Gibas-Dorna M, Adamczak-Ratajczak A, Bogdanski P, Krauss H. Gender-related effect of cold water swimming on the seasonal changes in lipid profile, ApoB/ApoA-I ratio, and homocysteine concentration in cold water swimmers. *J Physiol Pharmacol* 2017, 68, 887-896.
31. Chen L, Gong Q, Stice JP, Knowlton AA. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* 2009, 84, 91-99. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp181>
32. Chen G, Han Z, Feng D, Chen Y, Chen L, Wu H, Huang L, Zhou C, Cai X, Fu C, Duan L, Wang X, Liu L, Liu X, Shen Y, Zhu Y, Chen Q. A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Mol Cell* 2014, 54, 362-377. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.034>
33. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005, 280, 26185-26192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503062200>
34. Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 2007, 130, 548-562. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.026>
35. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 2010, 141, 280-289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.026>
36. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003, 160, 189-200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>
37. Chen Y, Sheng ZH. Kinesin-1-syntrophin coupling mediates activity-dependent regulation of axonal mitochondrial transport. *J Cell Biol* 2013, 202, 351-364. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302040>
38. Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 2006, 126, 163-175. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.021>
39. Civitarese AE, MacLean PS, Carling S, Kerr-Bayles L, McMillan RP, Pierce A, Becker TC, Moro C, Finlayson J, Lefort N, Newgard CB, Mandarino L, Cefalu W, Walder K, Collier GR, Hulver MW, Smith SR, Ravussin E. Regulation of skeletal muscle oxidative capacity and insulin signaling by the mitochondrial rhomboid protease PARL. *Cell Metab* 2010, 11, 412-426. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.004>
40. Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, Cipolat S, Costa V, Casarin A, Gomes LC, Perales-Clemente E, Salviati L, Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Scorrano L. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 2013, 155, 160-171. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.032>
41. Collier N, Lomax M, Harper M, Tipton M, Massey H. Habitual cold-water swimming and upper respiratory tract infection. *Rhinology* 2021, 59, 485-487. <https://doi.org/10.4193/Rhin21.068>
42. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 2002, 21, 1616-1627. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1616>

43. Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 2007, 8, 939-944. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401062>
44. Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* 2003, 52, 642-649. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.642>
45. De Giorgi F, Lartigue L, Ichas F. Electrical coupling and plasticity of the mitochondrial network. *Cell Calcium* 2000, 28, 365-370. <https://doi.org/10.1054/ceca.2000.0177>
46. De Vos KJ, Allan VJ, Grierson AJ, Sheetz MP. Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* 2005, 15, 678-683. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.064>
47. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000, 26, 207-210. <https://doi.org/10.1038/79936>
48. Delettre C, Lenaers G, Pelloquin L, Belenguer P, Hamel CP. OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* 2002, 75, 97-107. <https://doi.org/10.1006/mgme.2001.3278>
49. Demishtein-Zohary K, Azem A. The TIM23 mitochondrial protein import complex: function and dysfunction. *Cell Tissue Res* 2017, 367, 33-41. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2486-7>
50. Deng X, Zhang S, Wu J, Sun X, Shen Z, Dong J, Huang J. Promotion of Mitochondrial Biogenesis via Activation of AMPK-PGC1 α Signaling Pathway by Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extract, and Its Major Active Component 6-Gingerol. *J Food Sci* 2019, 84, 2101-2111. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14723>
51. Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res* 2014, 58, 193-210. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8517-0>
52. Dickey AS, Strack S. PKA/AKAP1 and PP2A/B β 2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *J Neurosci* 2011, 31, 15716-15726. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3159-11.2011>
53. Dimmer KS, Fritz S, Fuchs F, Messerschmitt M, Weinbach N, Neupert W, Westermann B. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2002, 13, 847-853. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-12-0588>
54. Dorn GW 2nd. Mitochondrial dynamics in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 2013, 1833, 233-241. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.03.008>
55. Dos Santos TW, Pereira QC, Teixeira L, Gambero A, A Villena J, Lima Ribeiro M. Effects of Polyphenols on Thermogenesis and Mitochondrial Biogenesis. *Int J Mol Sci* 2018, 19, 2757. <https://doi.org/10.3390/ijms19092757>
56. Duan Y, Zheng C, Zhong Y, Song B, Yan Z, Kong X, Deng J, Li F, Yin Y. β -hydroxy β -methyl butyrate decreases muscle protein degradation via increased Akt/FoxO3a signaling and mitochondrial biogenesis in weanling piglets after lipopolysaccharide challenge. *Food Funct* 2019, 10, 5152-5165. <https://doi.org/10.1039/c9fo00769e>
57. Dudley GA, Abraham WM, Terjung RL. Influence of exercise intensity and duration on biochemical adaptations in skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1982, 53, 844-850. <https://doi.org/10.1152/jappl.1982.53.4.844>
58. Dudley GA, Tullson PC, Terjung RL. Influence of mitochondrial content on the sensitivity of respiratory control. *J Biol Chem* 1987, 262, 9109-9114.

59. Dudzinska W, Lubkowska A. Changes in the concentration of purine and pyridine as a response to single whole-body cryostimulation. *Front Physiol.* 2021,12,634816. doi: 10.3389/fphys.2021.634816.
60. Dugué B, Leppänen E. Adaptation related to cytokines in man: effects of regular swimming in ice-cold water. *Clin Physiol* 2000, 20, 114-121. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2281.2000.00235.x>
61. Dulac S, Quirion A, DeCarufel D, LeBlanc J, Jobin M, Côte J, Brisson GR, Lavoie JM, Diamond P. Metabolic and hormonal responses to long-distance swimming in cold water. *Int J Sports Med* 1987, 8, 352-356. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1025683>
62. Dürr M, Escobar-Henriques M, Merz S, Geimer S, Langer T, Westermann B. Nonredundant roles of mitochondria-associated F-box proteins Mfb1 and Mdm30 in maintenance of mitochondrial morphology in yeast. *Mol Biol Cell* 2006, 17, 3745-3755. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0053>
63. Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG, Neupert W, Reichert AS. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 2006, 281, 37972-37979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606059200>
64. Eccles R, Wilkinson JE. Exposure to cold and acute upper respiratory tract infection. *Rhinology* 2015, 53, 99-106. <https://doi.org/10.4193/Rhino14.239>
65. Edgett BA, Foster WS, Hankinson PB, Simpson CA, Little JP, Graham RB, Gurd BJ. Dissociation of increases in PGC-1 α and its regulators from exercise intensity and muscle activation following acute exercise. *PLoS One* 2013, 8, e71623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071623>
66. Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, McCaffrey N, Moyna NM, Zierath JR, O'Gorman DJ. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol* 2010, 588, 1779-1790. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188011>
67. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011, 331, 456-461. <https://doi.org/10.1126/science.1196371>
68. Egner A, Jakobs S, Hell SW. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99, 3370-3375. <https://doi.org/10.1073/pnas.052545099>
69. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI, Langer T. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 2009, 187, 1023-1036. <https://doi.org/10.1083/jcb.200906084>
70. Elson JL, Samuels DC, Johnson MA, Turnbull DM, Chinnery PF. The length of cytochrome c oxidase-negative segments in muscle fibres in patients with mtDNA myopathy. *Neuromuscul Disord* 2002, 12, 858-864. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(02\)00047-0](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(02)00047-0)
71. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature* 2014, 505, 335-343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
72. Gibas-Dorna M, Chęcińska Z, Korek E, Kupsz J, Sowińska A, Krauss H. Cold Water Swimming Beneficially Modulates Insulin Sensitivity in Middle-Aged Individuals. *J Aging Phys Act* 2016a, 24, 547-554. <https://doi.org/10.1123/japa.2015-0222>

73. Gibas-Dorna M, Checinska Z, Korek E, Kupsz J, Sowinska A, Wojciechowska M, Krauss H, Piątek J. Variations in leptin and insulin levels within one swimming season in non-obese female cold water swimmers. *Scand J Clin Lab Invest* 2016b, 76, 486-491. <https://doi.org/10.1080/00365513.2016.1201851>
74. Gollnick PD, King DW. Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1969, 216, 1502-1509. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.216.6.1502>
75. Gollnick PD, Saltin B. Significance of skeletal muscle oxidative enzyme enhancement with endurance training. *Clin Physiol* 1982, 2, 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097x.1982.tb00001.x>
76. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 2011, 13, 589-598. <https://doi.org/10.1038/ncb2220>
77. Gorsich SW, Shaw JM. Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Mol Biol Cell* 2004, 15, 4369-4381. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0875>
78. Granata C, Oliveira RS, Little JP, Renner K, Bishop DJ. Training intensity modulates changes in PGC-1 α and p53 protein content and mitochondrial respiration, but not markers of mitochondrial content in human skeletal muscle. *FASEB J* 2016, 30, 959-970. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276907>
79. Gundle L, Atkinson A. Pregnancy, cold water swimming and cortisol: The effect of cold water swimming on obstetric outcomes. *Med Hypotheses* 2020, 144, 109977. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109977>
80. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 7111-7116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232352100>
81. Hawley JA, Morton JP. Ramping up the signal: promoting endurance training adaptation in skeletal muscle by nutritional manipulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014, 41, 608-613. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12246>
82. Hawley JA. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002, 29, 218-222. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03623.x>
83. Herlan M, Bornhövd C, Hell K, Neupert W, Reichert AS. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol* 2004, 165, 167-173. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403022>
84. Hermanussen M, Jensen F, Hirsch N, Friedel K, Kröger B, Lang R, Just S, Ulmer J, Schaff M, Ahnert P. Acute and chronic effects of winter swimming on LH, FSH, prolactin, growth hormone, TSH, cortisol, serum glucose and insulin. *Arctic Med Res* 1995, 54, 45-51.
85. Hoffman-Goetz L, German E. Cold acclimation and exercise as modulators of age associated hypothermia in mice. W: Cooper K, Lomax P, Schonbaum E, Veale WL (red.). *Homeostasis and Thermal Stress, 6th International Symposium on the Pharmacology of Thermoregulation*. Jasper, Alta, 1986, s. 46-48.
86. Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1967, 242, 2278-2282. Holloszy JO, Booth FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 1976, 38, 273-291. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.38.030176.001421>
87. Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1984, 56, 831-838. <https://doi.org/10.1152/jappl.1984.56.4.83193>.

88. Hood DA. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2001, 90, 1137-1157. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.3.1137>
89. Hoppeler H, Lüthi P, Claassen H, Weibel ER, Howald H. The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Arch* 1973, 344, 217-232. <https://doi.org/10.1007/BF00588462>
90. Hoppins S, Edlich F, Cleland MM, Banerjee S, McCaffery JM, Youle RJ, Nunnari J. The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell* 2011, 41, 150-160. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.030>
91. Huss JM, Kelly DP. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res* 2004, 95, 568-578. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000141774.29937.e3>
92. Huttunen P, Kokko L, Ylijokuri V. Winter swimming improves general well-being. *Int J Circumpolar Health* 2004, 63, 140-144. <https://doi.org/10.3402/ijch.v63i2.17700>
93. Huttunen P, Lando NG, Meshtsheryakov VA, Lyutov VA. Effects of long-distance swimming in cold water on temperature, blood pressure and stress hormones in winter swimmers. *J Therm Biol* 2000, 25, 171-174. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(99\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(99)00059-5)
94. Huttunen P, Rintamäki H, Hirvonen J. Effect of regular winter swimming on the activity of the sympathoadrenal system before and after a single cold water immersion. *Int J Circumpolar Health* 2001, 60, 400-406.
95. International Indian Statistical Association (IISA) [dostęp 15.01.2021], dostępne w: www.internationaliceswimming.com
96. International Winter Swimming Association (IWSA) [dostęp 1.12.2021], dostępne w: <https://iwsa.world>
97. Ishihara N, Jofuku A, Eura Y, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 301, 891-898. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00050-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00050-0)
98. Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 2006, 25, 2966-2977. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601184>
99. Jakobs S, Martini N, Schauss AC, Egner A, Westermann B, Hell SW. Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci* 2003, 116, 2005-2014. <https://doi.org/10.1242/jcs.00423>
100. Janský L, Pospíšilová D, Honzová S, Ulicný B, Sránek P, Zeman V, Kamínková J. Immune system of cold-exposed and cold-adapted humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996, 72, 445-450. <https://doi.org/10.1007/BF00242274>
101. Jensen RE, Hobbs AE, Cervený KL, Sesaki H. Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc Res Tech* 2000, 51, 573-583. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001215\)51:6<573::AID-JEMT7>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001215)51:6<573::AID-JEMT7>3.0.CO;2-2)
102. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, Kuo LH, Chang CS, Su IJ, Chang CR, Tsai YS. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2012, 32, 309-319. <https://doi.org/10.1128/MCB.05603-11>
103. Johnson DG, Hayward JS, Jacobs TP, Collis ML, Eckerson JD, Williams RH. Plasma norepinephrine responses of man in cold water. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1977, 43, 216-220. <https://doi.org/10.1152/jappl.1977.43.2.216>
104. Jones BA, Fangman WL. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 1992, 6, 380-389. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.380>

105. Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, Sher A, Byrne FL, Hoehn KL, Counter CM, Kashatus DF. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell* 2015, 57, 537-551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.002>
106. Kauppinen K, Pajari-Backas M, Volin P, Vakkuri O. Some endocrine responses to sauna, shower and ice water immersion. *Arctic Med Res* 1989, 48, 131-139.
107. Kiessling KH, Pilström L, Bylund AC, Saltin B, Piehl K. Enzyme activities and morphometry in skeletal muscle of middle-aged men after training. *Scand J Clin Lab Invest* 1974, 33, 63-69. <https://doi.org/10.3109/00365517409114199>
108. Kim H, Scimia MC, Wilkinson D, Trelles RD, Wood MR, Bowtell D, Dillin A, Mercola M, Ronai ZA. Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Mol Cell* 2011, 44, 532-544. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.045>
109. Kleinow W, Sebald W, Neupert W, Bücher T. Formation of mitochondria of *Locusta migratoria* flight muscle. W: Boardman NK, Linnane AW, Smillie RM (red.). *Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts*, Amsterdam, North-Holland Publishing Company, 1971, s. 140–151.
110. Knechtle B, Waśkiewicz Z, Sousa CV, Hill L, Nikolaidis PT. Cold Water Swimming-Benefits and Risks: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health* 2020, 17, 8984. <https://doi.org/10.3390/ijerph17238984>
111. Knechtle B, Stjepanovic M, Knechtle C, Rosemann T, Sousa CV, Nikolaidis PT. Physiological Responses to Swimming Repetitive "Ice Miles". *J Strength Cond Res* 2021, 35, 487-494. <https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000002690>
112. Kolettis TM, Kolettis MT. Winter swimming: healthy or hazardous?. Evidence and hypotheses. *Med Hypotheses* 2003, 61, 654-656. [https://doi.org/10.1016/s0306-9877\(03\)00270-6](https://doi.org/10.1016/s0306-9877(03)00270-6)
113. Konarzewski M, Diamond J. Peak sustained metabolic rate in cold-stressed mice. *Physiological Zoology* 1994, 67, 1186-1212.
114. Kormanovski A, Castañeda Ibarra F, Lara Padilla E, Campos Rodriguez R. Resistance to respiratory illness and antibody response in open water swimmers during training and long distance swims. *Int J Med Med Sci* 2010, 2, 80-87.
115. Koves TR, Li P, An J, Akimoto T, Slentz D, Ilkayeva O, Dohm GL, Yan Z, Newgard CB, Muoio DM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α -mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem* 2005, 280, 33588-33598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507621200>
116. Kralova Lesna I, Rychlikova J, Vavrova L, Vybiral S. Could human cold adaptation decrease the risk of cardiovascular disease? *J Therm Biol* 2015, 52, 192-198. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.07.007>
117. Kuhl JE, Ruderman NB, Musi N, Goodyear LJ, Patti ME, Crunkhorn S, Dronamraju D, Thorell A, Nygren J, Ljungkvist O, Degerblad M, Stahle A, Brismar TB, Andersen KL, Saha AK, Efendic S, Bavenholm PN. Exercise training decreases the concentration of malonyl-CoA and increases the expression and activity of malonyl-CoA decarboxylase in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 290, E1296-E1303. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00341.2005>
118. Labbé K, Murley A, Nunnari J. Determinants and functions of mitochondrial behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014, 30, 357-391. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155756>
119. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, de Carvalho FM, Damascena A, Domingos Chinen LT, Rocha RM, Asara JM, Kalluri R.

- PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 2014, 16, 992-1003, 1-15. <https://doi.org/10.1038/ncb3039>
120. Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 2002, 13, 4343-4354. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0330>
 121. Lehtonen JM, Forsström S, Bottani E, Viscomi C, Baris OR, Isoniemi H, Höckerstedt K, Österlund P, Hurme M, Jylhävä J, Leppä S, Markkula R, Heliö T, Mombelli G, Uusimaa J, Laaksonen R, Laaksovirta H, Auranen M, Zeviani M, Smeitink J, Wiesner RJ, Nakada K, Isohanni P, Suomalainen A. FGF21 is a biomarker for mitochondrial translation and mtDNA maintenance disorders. *Neurology* 2016, 87, 2290-2299. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003374>
 122. Leppäluoto J, Westerlund T, Huttunen P, Oksa J, Smolander J, Dugué B, Mikkelsen M. Effects of long-term whole-body cold exposures on plasma concentrations of ACTH, β -endorphin, cortisol, catecholamines and cytokines in healthy females. *Scand J Clin Lab Invest* 2008, 68, 145-153. <https://doi.org/10.1080/00365510701516350>
 123. Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004, 119, 873-887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.003>
 124. Liesa M, Palacín M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009, 89, 799-845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>
 125. Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science* 2015, 349, 1494-1499. <https://doi.org/10.1126/science.aac7516>
 126. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005, 1, 361-370. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>
 127. Lindeman S, Hirvonen J, Joukamaa M. Neurotic psychopathology and alexithymia among winter swimmers and controls--a prospective study. *Int J Circumpolar Health* 2002, 61, 123-130. <https://doi.org/10.3402/ijch.v61i2.17444>
 128. Linley JE, Ooi L, Pettinger L, Kirton H, Boyle JP, Peers C, Gamper N. Reactive oxygen species are second messengers of neurokinin signaling in peripheral sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109, E1578-E1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201544109>
 129. Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1989, 1, 642-645. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92145-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92145-4)
 130. Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, Bossy-Wetzel E. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* 2009, 16, 899-909. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.22>
 131. Lombardi G, Ricci C, Banfi G. Effect of winter swimming on haematological parameters. *Biochem Med (Zagreb)* 2011, 21, 71-78. <https://doi.org/10.11613/bm.2011.014>
 132. Loria P, Ottoboni S, Michelazzi L, Giuria R, Ghisellini P, Rando C, Eggenhoffner R. Salivary Cortisol in an Extreme Non-Competitive Sport Exercise: Winter Swimming. *Nat Sci* 2014, 6, 387-398. <https://doi.org/10.4236/ns.2014.66039>
 133. Losón OC, Liu R, Rome ME, Meng S, Kaiser JT, Shan SO, Chan DC. The mitochondrial fission receptor MiD51 requires ADP as a cofactor. *Structure* 2014, 22, 367-377. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.01.001>

134. Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 2013, 24, 659-667. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0721>
135. Lubkowska A, Dołęgowska B, Szyguła Z, Bryczkowska I, Stańczyk-Dunaj M, Sałata D, Budkowska M. Winter-swimming as a building-up body resistance factor inducing adaptive changes in the oxidant/antioxidant status. *Scand J Clin Lab Invest* 2013, 73, 315-325. <https://doi.org/10.3109/00365513.2013.773594>
136. Lubkowska A, Bryczkowska I, Gutowska I, Rotter I, Marczuk N, Baranowska-Bosiacka I, Banfi G. The Effects of Swimming Training in Cold Water on Antioxidant Enzyme Activity and Lipid Peroxidation in Erythrocytes of Male and Female Aged Rats. *Int J Environ Res Public Health*. 2019, 16(4):647. doi: 10.3390/ijerph16040647.
137. MacInnis MJ, Gibala MJ. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol* 2017, 595, 2915-2930. <https://doi.org/10.1113/JP273196>
138. Manolis AS, Manolis SA, Manolis AA, Manolis TA, Apostolaki N, Melita H. Winter Swimming: Body Hardening and Cardiorespiratory Protection Via Sustainable Acclimation. *Curr Sports Med Rep* 2019, 18, 401-415. <https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000653>
139. Marin TL, Gongol B, Zhang F, Martin M, Johnson DA, Xiao H, Wang Y, Subramaniam S, Chien S, Shyy JY. AMPK promotes mitochondrial biogenesis and function by phosphorylating the epigenetic factors DNMT1, RBBP7, and HAT1. *Sci Signal* 2017, 10, eaaf7478. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf7478>
140. Markan KR, Potthoff MJ. Metabolic fibroblast growth factors (FGFs): Mediators of energy homeostasis. *Semin Cell Dev Biol* 2016, 53, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.021>
141. McConell GK, Lee-Young RS, Chen ZP, Stepto NK, Huynh NN, Stephens TJ, Canny BJ, Kemp BE. Short-term exercise training in humans reduces AMPK signalling during prolonged exercise independent of muscle glycogen. *J Physiol* 2005, 568, 665-676. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.089839>
142. Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed *in vitro*. *Science* 2004, 305, 1747-1752. <https://doi.org/10.1126/science.1100612>
143. Meirhaeghe A, Crowley V, Lenaghan C, Lelliott C, Green K, Stewart A, Hart K, Schinner S, Sethi JK, Yeo G, Brand MD, Cortright RN, O'Rahilly S, Montague C, Vidal-Puig AJ. Characterization of the human, mouse and rat PGC1 β (peroxisome-proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 β) gene *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J* 2003, 373, 155-165. <https://doi.org/10.1042/BJ20030200>
144. Melser S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W, Jose C, Obre E, Goorden S, Priault M, Elgersma Y, Rezvani HR, Rossignol R, Bénard G. Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab* 2013, 17, 719-730. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.014>
145. Mercer SW, Trayhurn P. The development of insulin resistance in brown adipose tissue may impair the acute cold-induced activation of thermogenesis in genetically obese (ob/ob) mice. *Biosci Rep* 1984, 4, 933-940. <https://doi.org/10.1007/BF01116891>
146. Merz S, Hammermeister M, Altmann K, Dürr M, Westermann B. Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. *Biol Chem* 2007, 388, 917-926. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.110>
147. Merz S, Westermann B. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol* 2009, 10, R95. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r95>

148. Mila-Kierzenkowska C, Woźniak A, Szpinda M, Boraczyński T, Woźniak B, Rajewski P, Sutkowy P. Effects of thermal stress on the activity of selected lysosomal enzymes in blood of experienced and novice winter swimmers. *Scand J Clin Lab Invest* 2012, 72, 635-641. <https://doi.org/10.3109/00365513.2012.727214>
149. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol* 2016, 212, 379-387. <https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>
150. Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2014a, 19, 630-641. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.011>
151. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014b, 15, 634-646. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>
152. Mishra P, Varuzhanyan G, Pham AH, Chan DC. Mitochondrial Dynamics is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization. *Cell Metab* 2015, 22, 1033-1044. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.027>
153. Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 11960-11965. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904875106>
154. Mondon CE, Dolkas CB, Reaven GM. Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. *Am J Physiol* 1980, 239, E169-E177. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1980.239.3.E169>
155. Mortensen OH, Plomgaard P, Fischer CP, Hansen AK, Pilegaard H, Pedersen BK. PGC-1 β is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day vs. once daily on expression of the PGC-1 family. *J Appl Physiol* (1985) 2007, 103, 1536-1542. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00575.2007>
156. Mourier A, Motori E, Brandt T, Lagouge M, Atanassov I, Galinier A, Rappal G, Brodesser S, Hultenby K, Dieterich C, Larsson NG. Mitofusin 2 is required to maintain mitochondrial coenzyme Q levels. *J Cell Biol* 2015, 208, 429-442. <https://doi.org/10.1083/jcb.201411100>
157. Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, Nonaka I, Hayashi JI. Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat Med* 2001, 7, 934-940. <https://doi.org/10.1038/90976>
158. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10, 458-467. <https://doi.org/10.1038/nrm2708>
159. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010, 8, e1000298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>
160. Novotna A, Dorcakova A, Pavek P, Dvorak Z. Construction and characterization of peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α (PGC-1 α over-expressing cell line derived from human hepatocyte carcinoma HepG2 cells). *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013, 157, 214-221. <https://doi.org/10.5507/bp.2012.075>
161. Ogata T, Yamasaki Y. Scanning electron-microscopic studies on the three-dimensional structure of sarcoplasmic reticulum in the mammalian red, white and intermediate muscle fibers. *Cell Tissue Res* 1985, 242, 461-467. <https://doi.org/10.1007/BF00225410>

162. Okatsu K, Koyano F, Kimura M, Kosako H, Saeki Y, Tanaka K, Matsuda N. Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. *J Cell Biol* 2015, 209, 111-128. <https://doi.org/10.1083/jcb.201410050>
163. Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 2001, 28, 272-275. <https://doi.org/10.1038/90116>
164. Oscai LB, Holloszy JO. Biochemical adaptations in muscle. II. Response of mitochondrial adenosine triphosphatase, creatine phosphokinase, and adenylate kinase activities in skeletal muscle to exercise. *J Biol Chem* 1971, 246, 6968-6972.
165. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 2010, 191, 1141-1158. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007152>
166. Pagel-Langenickel I, Bao J, Pang L, Sack MN. The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance. *Endocr Rev* 2010, 31, 25-51. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0003>
167. Palmer CS, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal* 2011, 23, 1534-1545. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.021>
168. Parra J, Cadefau JA, Rodas G, Amigó N, Cussó R. The distribution of rest periods affects performance and adaptations of energy metabolism induced by high-intensity training in human muscle. *Acta Physiol Scand* 2000, 169, 157-165. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00730.x>
169. Parra V, Verdejo HE, Iglewski M, Del Campo A, Troncoso R, Jones D, Zhu Y, Kuzmicic J, Pennanen C, Lopez-Crisosto C, Jaña F, Ferreira J, Noguera E, Chiong M, Bernlohr DA, Klip A, Hill JA, Rothermel BA, Abel ED, Zorzano A, Lavandero S. Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the Akt-mTOR-NFκB-Opa-1 signaling pathway. *Diabetes* 2014, 63, 75-88. <https://doi.org/10.2337/db13-0340>
170. Pereira RO, Tadinada SM, Zasadny FM, Oliveira KJ, Pires KMP, Olvera A, Jeffers J, Souvenir R, Mcglaufflin R, Seei A, Funari T, Sesaki H, Potthoff MJ, Adams CM, Anderson EJ, Abel ED. OPA1 deficiency promotes secretion of FGF21 from muscle that prevents obesity and insulin resistance. *EMBO J* 2017, 36, 2126-2145. <https://doi.org/10.15252/embj.201696179>
171. Pernas L, Scorrano L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol* 2016, 78, 505-531. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105011>
172. Perry CG, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol* 2010, 588, 4795-4810. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199448>
173. Perry CG, Talanian JL, Heigenhauser GJ, Spriet LL. The effects of training in hyperoxia vs. normoxia on skeletal muscle enzyme activities and exercise performance. *J Appl Physiol* (1985) 2007, 102, 1022-1027. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01215.2006>
174. Pfluger PT, Kabra DG, Aichler M, Schriever SC, Pfuhlmann K, García VC, Lehti M, Weber J, Kutschke M, Rozman J, Elrod JW, Hevener AL, Feuchtinger A, Hrabě de Angelis M, Walch A, Rollmann SM, Aronow BJ, Müller TD, Perez-Tilve D, Jastroch M, De Luca M, Molkenstein JD, Tschöp MH. Calcineurin Links Mitochondrial Elongation with Energy Metabolism. *Cell Metab* 2015, 22, 838-850. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.022>

175. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 2003, 546, 851-858. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.034850>
176. Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, Compagno C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet* 2006, 22, 183-186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
177. Pletjushkina OY, Lyamzaev KG, Popova EN, Nepryakhina OK, Ivanova OY, Domnina LV, Chernyak BV, Skulachev VP. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1757, 518-524. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.03.018>
178. Pulliam DA, Bhattacharya A, Van Remmen H. Mitochondrial dysfunction in aging and longevity: a causal or protective role? *Antioxid Redox Signal* 2013, 19, 1373-1387. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4950>
179. Pyakurel A, Savoia C, Hess D, Scorrano L. Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis. *Mol Cell* 2015, 58, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.021>
180. Qin Q, Jin J, He F, Zheng Y, Li T, Zhang Y, He J. Humanin promotes mitochondrial biogenesis in pancreatic MIN6 β -cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 497, 292-297. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.071>
181. Quirós PM, Ramsay AJ, Sala D, Fernández-Vizarra E, Rodríguez F, Peinado JR, Fernández-García MS, Vega JA, Enríquez JA, Zorzano A, López-Otín C. Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. *EMBO J* 2012, 31, 2117-2133. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.70>
182. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108, 10190-10195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107402108>
183. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 2012, 24, 981-990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
184. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 1998, 280, 1763-1766. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>
185. Rodas G, Ventura JL, Cadefau JA, Cussó R, Parra J. A short training programme for the rapid improvement of both aerobic and anaerobic metabolism. *Eur J Appl Physiol* 2000, 82, 480-486. <https://doi.org/10.1007/s004210000223>
186. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 2004, 64, 985-993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-1101>
187. Sadana P, Park EA. Characterization of the transactivation domain in the peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator (PGC-1). *Biochem J* 2007, 403, 511-518. <https://doi.org/10.1042/BJ20061526>
188. Saleem A, Carter HN, Hood DA. p53 is necessary for the adaptive changes in cellular milieu subsequent to an acute bout of endurance exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014, 306, C241-C249. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00270.2013>
189. Santel A, Frank S. Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 2008, 60, 448-455. <https://doi.org/10.1002/iub.71>

190. Santo-Domingo J, Giacomello M, Poburko D, Scorrano L, Demaurex N. OPA1 promotes pH flashes that spread between contiguous mitochondria without matrix protein exchange. *EMBO J* 2013, 32, 1927-1940. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.124>
191. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, Harper JW. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature* 2013, 496, 372-376. <https://doi.org/10.1038/nature12043>
192. Sato A, Nakada K, Hayashi J. Mitochondrial dynamics and aging: Mitochondrial interaction preventing individuals from expression of respiratory deficiency caused by mutant mtDNA. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1763, 473-481. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.03.001>
193. Sauvanet C, Duvezin-Caubet S, di Rago JP, Rojo M. Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin Cell Dev Biol* 2010, 21, 558-565. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.006>
194. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002, 1576, 1-14. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00343-3](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00343-3)
195. Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2006, 97, 673-683. <https://doi.org/10.1002/jcb.20743>
196. Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T, Osiewacz HD. Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol* 2007, 9, 99-105. <https://doi.org/10.1038/ncb1524>
197. Scheckhuber CQ, Wanger RA, Mignat CA, Osiewacz HD. Unopposed mitochondrial fission leads to severe lifespan shortening. *Cell Cycle* 2011, 10, 3105-3110. <https://doi.org/10.4161/cc.10.18.17196>
198. Shamseldin HE, Alshammari M, Al-Sheddi T, Salih MA, Alkhalidi H, Kentab A, Repetto GM, Hashem M, Alkuraya FS. Genomic analysis of mitochondrial diseases in a consanguineous population reveals novel candidate disease genes. *J Med Genet* 2012, 49, 234-241. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100836>
199. Shevchuk NA. Adapted cold shower as a potential treatment for depression. *Med Hypotheses* 2008, 70, 995-1001. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.04.052>
200. Shutt T, Geoffrion M, Milne R, McBride HM. The intracellular redox state is a core determinant of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 2012, 13, 909-915. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.128>
201. Siems WG, Brenke R, Sommerburg O, Grune T. Improved antioxidative protection in winter swimmers. *QJM* 1999, 92, 193-198. <https://doi.org/10.1093/qjmed/92.4.193>
202. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 2001, 26, 23-29. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01735-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01735-7)
203. Smolenski RT, Lachno DR, Ledingham SJ, Yacoub MH. Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J Chromatogr* 1990, 527, 414-420. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)82125-8](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)82125-8)
204. Song M, Franco A, Fleischer JA, Zhang L, Dorn GW 2nd. Abrogating Mitochondrial Dynamics in Mouse Hearts Accelerates Mitochondrial Senescence. *Cell Metab* 2017, 26, 872-883.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.023>
205. Song S, Attia RR, Connaughton S, Niesen MI, Ness GC, Elam MB, Hori RT, Cook GA, Park EA. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) and PPAR γ coactivator (PGC-1 α) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol Cell Endocrinol* 2010, 325, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.05.019>

206. Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 2007, 178, 749-755. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704110>
207. Stevens B. Mitochondrial structure. W: Strathern EW, Jones EW, Broach JR (red.). *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Press, New York, Cold Spring Harbor, 1981, s. 471–504.
208. Sugiura A, McLelland GL, Fon EA, McBride HM. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J* 2014, 33, 2142-2156. <https://doi.org/10.15252/emboj.201488104>
209. Teległów A, Bilski J, Dąbrowski Z, Marchewka A, Jaśkiewicz J, Gdula-Argasińska J, Głodzik J, Tabarowski Z, Lizak D. The effects of exercise in water at 4°C and 25°C on the rheological properties of blood and the composition of fatty acids in the erythrocyte membranes of laboratory rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2012, 51, 139-148. <https://doi.org/10.3233/CH-2011-1521>
210. Teległów A, Marchewka J, Tabarowski Z, Rembiasz K, Głodzik J, Scisłowska-Czarnecka A. Comparison of Selected Morphological, Rheological and Biochemical Parameters of Winter Swimmers' Blood at the End of One Winter Swimming Season and at the Beginning of Another. *Folia Biol (Krakow)* 2015, 63, 221-228. https://doi.org/10.3409/fb63_3.221
221. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, Larrouy D, Bouillaud F, Ricquier D, Langin D. Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem* 2003, 278, 33370-33376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305235200>
222. Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P, Raschke I, Merkwirth C, Ehses S, Krause F, Chan DC, Alexander C, Bauer C, Youle R, Langer T, Martinou JC. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 2009, 28, 1589-1600. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.89>
223. Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, Lewis TL Jr, Losón OC, Hellberg K, Young NP, Chen H, Polleux F, Chan DC, Shaw RJ. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* 2016, 351, 275-281. <https://doi.org/10.1126/science.aab4138>
224. Trincat L, Woorons X, Millet GP. Repeated-Sprint Training in Hypoxia Induced by Voluntary Hypoventilation in Swimming. *Int J Sports Physiol Perform* 2017, 12, 329-335. <https://doi.org/10.1123/ijsspp.2015-0674>
225. Tsushima K, Bugger H, Wende AR, Soto J, Jenson GA, Tor AR, McGlaufflin R, Kenny HC, Zhang Y, Souvenir R, Hu XX, Sloan CL, Pereira RO, Lira VA, Spitzer KW, Sharp TL, Shoghi KI, Sparagna GC, Rog-Zielinska EA, Kohl P, Khalimonchuk O, Schaffer JE, Abel ED. Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Lipotoxic Hearts Induce Post-Translational Modifications of AKAP121, DRP1, and OPA1 That Promote Mitochondrial Fission. *Circ Res* 2018, 122, 58-73. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311307>
226. Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 2008a, 1777, 1092-1097. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.05.001>
227. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008b, 27, 433-446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
228. Ueda M, Watanabe K, Sato K, Akiba Y, Toyomizu M. Possible role for avPGC-1 α in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal

- muscles of cold-exposed chickens. FEBS Lett 2005, 579, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.039>
229. Van Tulleken C, Tipton M, Massey H, Harper CM. Open water swimming as a treatment for major depressive disorder. BMJ Case Rep 2018, 2018, bcr2018225007. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-225007>
230. Vanstone JR, Smith AM, McBride S, Naas T, Holcik M, Antoun G, Harper ME, Michaud J, Sell E, Chakraborty P, Tetreault M; Care4Rare Consortium, Majewski J, Baird S, Boycott KM, Dymont DA, MacKenzie A, Lines MA. DNMI1L-related mitochondrial fission defect presenting as refractory epilepsy. Eur J Hum Genet 2016, 24, 1084-1088. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.243>
231. Varnauskas E, Björntorp P, Fahlén M, Prerovský I, Stenberg J. Effects of physical training on exercise blood flow and enzymatic activity in skeletal muscle. Cardiovasc Res 1970, 4, 418-422. <https://doi.org/10.1093/cvr/4.4.418>
232. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. FEBS J 2015, 282, 647-672. <https://doi.org/10.1111/febs.13175>
233. Visser W, van Spronsen EA, Nanninga N, Pronk JT, Gijs Kuenen J, van Dijken JP. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek 1995, 67, 243-253. <https://doi.org/10.1007/BF00873688>
234. Wadley GD, Lee-Young RS, Canny BJ, Wasuntarawat C, Chen ZP, Hargreaves M, Kemp BE, McConell GK. Effect of exercise intensity and hypoxia on skeletal muscle AMPK signaling and substrate metabolism in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006, 290, E694-E702. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00464.2005>
235. Wang JS, Huang YH. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. Eur J Appl Physiol 2005, 95, 290-297. <https://doi.org/10.1007/s00421-005-0005-8>
236. Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. N Engl J Med 2007, 356, 1736-1741. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa064436>
237. Watt MJ, Southgate RJ, Holmes AG, Febbraio MA. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and δ and PPAR coactivator 1 α in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. J Mol Endocrinol 2004, 33, 533-544. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01499>
238. Wcisło M, Teległów A, Marchewka J. Effect of winter swimming on morphological parameters of blood and a thermal evaluation of the body based on winter swimmers. Med Rehabil 2014, 18, 4-10.
239. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. Biochim Biophys Acta 2012, 1817, 1833-1838. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.033>
240. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. Nat Rev Mol Cell Biol 2010, 11, 872-884. <https://doi.org/10.1038/nrm3013>
241. Wikstrom JD, Mahdavian K, Liesa M, Sereda SB, Si Y, Las G, Twig G, Petrovic N, Zingaretti C, Graham A, Cinti S, Corkey BE, Cannon B, Nedergaard J, Shirihai OS. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. EMBO J 2014, 33, 418-436. <https://doi.org/10.1002/emboj.201385014>
242. Williams RS, Salmons S, Newsholme EA, Kaufman RE, Mellor J. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. J Biol Chem 1986, 261, 376-380.

243. Wilson TJ, Slupe AM, Strack S. Cell signaling and mitochondrial dynamics: Implications for neuronal function and neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 2013, 51, 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.01.009>
244. Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 2000, 88, 2219-2226. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.6.2219>
245. Yan Y, Yang X, Zhao T, Zou Y, Li R, Xu Y. Salicylates promote mitochondrial biogenesis by regulating the expression of PGC-1 α in murine 3T3-L1 pre-adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2017, 491, 436-441. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.074>
246. Yao K, Zhang WW, Yao L, Yang S, Nie W, Huang F. Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the PGC-1/TFAM pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 470, 961-966. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.089>
247. Yokokawa T, Kido K, Suga T, Isaka T, Hayashi T, Fujita S. Exercise-induced mitochondrial biogenesis coincides with the expression of mitochondrial translation factors in murine skeletal muscle. *Physiol Rep* 2018, 6, e13893. <https://doi.org/10.14814/phy2.13893>
248. Zenner RJ, De Decker DE, Clement DL. Blood-pressure response to swimming in ice-cold water. *Lancet* 1980, 1, 120-121. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)90605-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(80)90605-4)
249. Zhang CL, Feng H, Li L, Wang JY, Wu D, Hao YT, Wang Z, Zhang Y, Wu LL. Globular CTRP3 promotes mitochondrial biogenesis in cardiomyocytes through AMPK/PGC-1 α pathway. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2017, 1861, 3085-3094. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.022>
250. Zhang K, Li H, Song Z. Membrane depolarization activates the mitochondrial protease OMA1 by stimulating self-cleavage. *EMBO Rep* 2014a, 15, 576-585. <https://doi.org/10.1002/embr.201338240>
251. Zhang S, Hulver MW, McMillan RP, Cline MA, Gilbert ER. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab (Lond)* 2014b, 11, 10. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-10>
252. Zhao LJ, Zhang SF. Activation of TGR5 promotes mitochondrial biogenesis in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 500, 952-957. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.210>
253. Zorzano A, Claret M. Implications of mitochondrial dynamics on neurodegeneration and on hypothalamic dysfunction. *Front Aging Neurosci* 2015, 7, 101. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00101>
254. Zorzano A, Hernández-Alvarez MI, Palacín M, Mingrone G. Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the nuclear co-factors PGC-1 α or PGC-1 β and mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2010a, 1797, 1028-1033. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.017>
255. Zorzano A, Liesa M, Sebastián D, Segalés J, Palacín M. Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2010b, 21, 566-574. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2010.01.002>
256. Züchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schröder JM, Vance JM. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004, 36, 449-451. <https://doi.org/10.1038/ng1341>

SPIS RYCIN

Rycina 1. Dynamika mitochondriów

Rycina 2. Metabolizm i dynamika mitochondriów

Rycina 3. Regulacja metaboliczna fuzji mitochondrialnej

Rycina 4. Regulacja metaboliczna fizji mitochondriów

Rycina 5. Biogeneza mitochondriów

Rycina 6. Schematyczne przedstawienie procedur badawczych zastosowanych w eksperymencie

Rycina 7. Stężenie adenozylo trifosforanu (ATP) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 8. Stężenie adenozylo trifosforanu (ATP) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 9. Stężenie adenozylo difosforanu (ADP) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 10. Stężenie adenozylo difosforanu (ADP) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 11. Stężenie adenozylo monofosforanu (AMP) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 12. Stężenie adenozylo monofosforanu (AMP) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 13. Stężenie adenozyliny (Ado) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 14. Stężenie adenozyliny (Ado) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 15. Pula nukleotydów adeninowych (TAN) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 16. Pula nukleotydów adeninowych (TAN) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 17. Wartość ładunku energetycznego adenylanów (AEC) w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 18. Wartość ładunku energetycznego adenylanów (AEC) w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 19. Ekspresja PGC-1 α w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 20. Ekspresja PGC-1 α w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 21. Ekspresja Mfn1 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 22. Ekspresja Mfn1 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 23. Ekspresja Mfn2 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 24. Ekspresja Mfn2 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 25. Ekspresja Opa1 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 26. Ekspresja Opa1 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 27. Ekspresja Drp1 w mięśniach samców szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

Rycina 28. Ekspresja Drp1 w mięśniach samic szczurów z grupy kontrolnej i grup badanych

SPIS TABEL

Tabela 1. Skład żeli poliakrylamidowych

Tabela 2. Warunki immunodetekcji zastosowane do analizy ekspresji białek metodą Western blot

ANEKS