

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové



Metabolismus proteinů v izolovaném kosterním svalu potkana – vliv inhibitorů proteazomu.

Disertační práce

Autor:
Mgr. Tomáš Muthný

Školitel:
Doc. MUDr. Ivan Tilšer, CSc.
Katedra farmakologie a toxikologie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Školitel-specialista:
Prof. MUDr. Milan Holeček, DrSc.
Ústav fyziologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Hradec Králové 2010

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Poděkování

Děkuji oběma mým školitelům. Doc. MUDr. Ivanu Tilšerovi, CSc. za trpělivé a vždy vstřícné vedení během mého postgraduálního studia. Prof. MUDr. Milanu Holečkovi, DrSc., v jehož laboratoři na Ústavu fyziologie LF UK HK práce vznikla, za nové obzory, které mi otevřel a nedocenitelné zkušenosti, které mi předal, a z nichž čerpám dodnes.

Děkuji Mgr. Miroslavu Kovaříkovi, Ing. Luďku Šišperovi, PhD., Radaně Ryšavé, Haně Buzkové, MUDr. Romanu Šafránkovi, PhD. a PharmDr. Janě Tisančinové, PhD. za plodnou spolupráci ve vynikající atmosféře.

Za všestrannou podporu a bezmeznou trpělivost děkuji mé ženě a rovněž mým blízkým.

Děkuji také všem přímo nejmenovaným, kteří jakkoliv přispěli ke vzniku této práce.

Práce byla finančně podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620820.

OBSAH

Seznam použitých zkratek.....	6
1 ÚVOD.....	7
1.1 Metabolismus bílkovin v kosterním svalstvu a proteinová bilance organismu.....	7
1.2 Ubiquitin-proteazomální systém (UPS).....	9
1.2.1 Struktura 26S proteazomálního komplexu	10
1.2.1.1 20S jádro proteazomálního komplexu	10
1.2.1.2 19S regulační jednotky proteazomálního komplexu	10
1.2.2 Mechanismus degradace proteinů ubiquitin-proteazomálním systémem	12
1.2.2.1 Ubiquitin – determinant proteinů pro degradaci v UPS.....	12
1.2.2.2 Mechanismus polyubiquitinace.....	12
1.2.2.3 Polyubiquitinace jako substrátově specifický proces	12
1.2.2.3.1 HECT E3 ligázy.....	13
1.2.2.3.2 RING E3 ligázy	13
1.3 Degradace proteinů kosterního svalstva u proteokatabolických stavů - význam UPS	13
1.3.1 Humorální reakce organismu ve stavech spojených s úbytkem svalové hmoty	14
1.3.2 Aktivace UPS v proteokatabolickém stavu na molekulární úrovni	14
1.4 Inhibitory proteazomální degradace	15
1.4.1 Inhibitory proteazomu	16
1.4.1.1 Přehled inhibitorů proteazomu.....	16
1.4.1.2 Mechanismus účinku inhibitorů proteazomu.....	19
1.4.1.2.1 Aldehydicke inhibitory proteazomu.....	19
1.4.1.2.2 Vinylsulfonové inhibitory proteazomu.....	19
1.4.1.2.3 Boronátové inhibitory proteazomu.....	20
1.4.1.2.4 Laktonové inhibitory proteazomu	20
1.4.1.2.5 Epoxyketonové inhibitory proteazomu	20
1.4.1.2.6 Ostatní inhibitory proteazomu	20
1.4.2 Inhibitory proteazomální degradace neovlivňující proteazom	21
2 CÍLE PRÁCE.....	22
3 MATERIÁL A METODY.....	23
3.1 Experimentální zvířata	23
3.2 Materiál.....	23
3.3 Izolace kosterních svalů potkana	24
3.4 Inkubace izolovaných svalů.....	24
3.5 Proteosyntéza a oxidace leucinu v izolovaných svalech	25
3.6 Celková a myofibrilární proteolýza v izolovaných svalech	27
3.7 Hmotnost izolovaného svalu	28
3.8 Koncentrace aminokyselin v médiích.....	28
3.9 Chymotrypsinová aktivita proteazomu.....	29
3.10 Aktivita katepsinů B a L.....	29
3.11 Modely proteokatabolického stavu (zánětu)	30
3.11.1 Subkutánní aplikace terpentýnového oleje.....	30
3.11.2 Intraperitoneální aplikace lipopolysacharidů E. coli.....	30
3.12 Ostatní metody	30
3.13 Statistické zpracování	31
4 VÝSLEDKY	32
4.1 Porovnání modelu lokálního zánětu (terpentýnový olej) a sepse (endotoxin) z pohledu vlivu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů potkanů.	32
4.2 Vliv nových inhibitorů proteazomu, belaktosinu A a C, na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních potkanů	42
4.3 Vliv bortezomibu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních a septických potkanů	47
5 DISKUZE.....	56

5.1	Porovnání modelu lokálního zánětu (terpentýnový olej) a sepse (endotoxin) z pohledu vlivu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů potkanů	56
5.2	Vliv nových inhibitorů proteazomu, belaktosinu A a C, na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních potkanů	58
5.3	Vliv bortezomibu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních a septických potkanů	60
6	ZÁVĚRY	62
7	LITERATURA	64
8	SOUHRN	79
9	SUMMARY	81
10	PŘÍLOHY	83
10.1	Příloha 1: Obrazová dokumentace k metodické části	83
10.2	Příloha 2: Publikované práce	84
10.2.1	In extenso	84
10.2.1.1	Muthny T, Kovarik M, Sispera L, de Meijere A, Larionov OV, Tilser I, Holecek M: The effect of new proteasome inhibitors, belaktosin A and C, on protein metabolism in isolated rat skeletal muscle. <i>J Physiol Biochem</i> 2009;65(2),137-146	84
10.2.1.2	Muthny T, Kovarik M, Sispera L, Tilser I, Holecek M: Protein metabolism in slow- and fast-twitch skeletal muscle during turpentine-induced inflammation. <i>Int J Exp Pathol</i> 2008;89(1):64-71	85
10.2.1.3	Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L: Proteasome inhibitor MG-132 enhances whole-body protein turnover in rat. <i>Biochem Biophys Res Commun</i> 2006;345(1):38-42	86
10.2.1.4	Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L: Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. <i>Food Chem Toxicol</i> 2009;47(1):255-9	87
10.2.1.5	Kovarik M, Muthny T, Holecek M: Beta-hydroxy-beta-methylbutyrát – od potravinového doplňku k terapii kachexie? <i>Klin Biochem Metab</i> 2007;15(36):No.4,193-199	88
10.2.1.6	Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L: Simultaneous infusion of glutamine and branched-chain amino acids (BCAA) to septic rats does not have more favorable effect on protein synthesis in muscle, liver, and small intestine than separate infusions. <i>JPEN J Parenter Enteral Nutr</i> 2006;30(6):467-73	89
10.2.1.7	Safránek R, Holecek M, Sispera L, Muthný T: Aspects of protein and amino acid metabolism in a model of severe glutamine deficiency in sepsis. <i>Ann Nutr Metab</i> 2006;50(4):361-7	90
10.2.2	Přednášky, abstrakta, postery	91

Seznam použitých zkratk

3MH	3-methylhistidin
AMC	7-amino-4-methylkumarin
ATP	adenosin trifosfát
BCAA	branched-chain amino acids (aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - ILE, LEU, VAL)
E6-AP	protein asociovaný s E6 onkoproteinem
EDL	musculus extensor digitorum longus
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
FOXO	forkhead box transcription factors O
HECT	homologous to the E6-AP carboxyl terminus
CHTLA	chymotrypsinová aktivita
IL-1 β	interleukin 1 β
IP	inhibitor proteazomu
MAFbx	muscle Atrophy F-box
MuRF1	muscle RING finger 1
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NF- κ B	nukleární faktor κ B
PI3K/PKB	fosfatidylinositol 3 kináza/protein kináza B
PIF	proteolýzu indukující faktor
RING	really interesting new gene
ROS	reactive oxygen species (reaktivní kyslíkové částice)
SOL	musculus soleus
TGF- β	transformační růstový faktor β
TNF- α	tumor nekrotický faktor α
UPS	ubiquitin-proteazomální systém

1 ÚVOD

1.1 Metabolismus bílkovin v kosterním svalstvu a proteinová bilance organismu

Význam bílkovin jako jedné ze tří hlavních složek potravy a základního stavebního kamene živé hmoty je nepopíratelný. Bílkoviny, regulační i strukturní, participují na všech fyziologických i patologických reakcích. V organismu probíhá neustálá syntéza a degradace proteinů jako odpověď na vnější a vnitřní podněty. Organismus se tak zbavuje poškozených, nefunkčních nebo nepotřebných bílkovin a tvoří místo nich nové. Cílem tohoto dynamického procesu je udržení homeostázy.

Obrat proteinů v organismu je determinován rychlostí syntézy a rozpadu bílkovin a závisí na typu proteinu, tkáni a stavu organismu. Za fyziologických podmínek představuje asi 280 g denně. To znamená, že každý den je nově vytvořeno 280 g bílkovin a stejné množství jich je odbouráno. Regulační proteiny jako hormony, neuromodulátory, enzymy, plazmatické bílkoviny, cytokiny a další mají poločas rozpadu v řádu minut až dní. Naopak poločas strukturních bílkovin se pohybuje v intervalu týdnů až měsíců. Jako příklad mohou posloužit kontraktilní proteiny kosterního svalstva, aktin a myozin, s poločasem dva až šest týdnů (Lodish a kol. 2001). Obrat proteinů se snižuje například při hladovění, což brání jejich rychlým ztrátám a snižuje energetické nároky organismu. Zvýšení proteinového obratu je zase typické pro sepsi či onkologická onemocnění, kde má zajistit urychlené odstranění poškozených a nepotřebných proteinů a syntézu v dané situaci prioritních látek. Tyto procesy jsou běžné a organismu prospěšné, avšak zejména v dlouhodobějším časovém horizontu se mohou podílet na snížení obranyschopnosti organismu nebo rozvoji negativní proteinové bilance.

U zdravého dospělého jedince je celková bilance proteinů (poměr syntézy a odbourávání všech bílkovin obsažených v organismu) vyvážená. Proteosyntéza převažuje fyziologicky v období růstu, v rekonvalescenci po prodělané nemoci a při reparaci tkání. Charakteristicky je zvýšená také ve tkáni postižené nádorovým onemocněním. Převahu odbourávání bílkovin nad jejich syntézou pozorujeme při hladovění, v období stáří a u řady patologických stavů (např. sepse, nádorová onemocnění, chronická onemocnění ledvin, acidóza, popáleniny, svalová denervace,

inzulinopenie). V závažných případech může rozdíl mezi proteosyntézou a proteolýzou dosáhnout až - 260 g bílkovin denně. Toto množství odpovídá přibližně jednomu kilogramu svalové hmoty, která slouží mimo jiné jako hlavní zásobárna proteinů v organismu člověka. Úbytek kosterní svaloviny pak vede k rozvoji kachexie, celkovému vyčerpání organismu, zpomalení rekonvalescence a vyšší úmrtnosti (Brink a kol. 2002). Negativní proteinová bilance může nastat jednou ze čtyř možností – nárůstem proteolýzy, poklesem proteosyntézy, vyšším nárůstem degradace než syntézy a menším poklesem degradace než syntézy.

Kosterní svalovina není homogenní tkání. Jejími základními strukturálními elementy jsou kontraktilní bílkoviny aktin a myozin. Ty spolu s dalšími bílkovinami (nebulin, tropomyozin, troponin, titin, ...) tvoří myofibrily, které představují hlavní stavební kameny mnohjaderných buněčných útvarů označovaných jako svalová vlákna. Rozlišujeme dva základní typy svalových vláken (I. a II. typu), která se liší jak ve fyzikálních, tak v biochemických parametrech. Typ vlákna je určen konkrétní dominantně exprimovanou izoformou těžkého myozinového řetězce (Rivero a kol. 1996). V současné době je známo minimálně deset genů kódujících těžké řetězce myozinu a v souvislosti s tím sedm subtypů svalových vláken (I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID a IIDB). Avšak většina svalových vláken exprimuje více izoform těžkých myozinových řetězců v různých poměrech a množstvích (Sant'ana Pereira a kol. 1995). Navíc exprese těžkých myozinů není stálá a může se měnit v závislosti na podmínkách v organismu (Pette a Staron 2000). Zmíněné třídění je tak pouze orientační a v dalším textu se proto přidržíme pouze dělení vláken na dva základní typy.

Vlákna I. typu mají užší průměr, obsahují vyšší množství mitochondrií a myoglobinu, jako zdroj energie využívají převážně glukózu a volné mastné kyseliny, kontrahují a regenerují pomaleji a méně intenzivně, jsou však také pomaleji unavitelná (Schiaffino a Reggiani 1996, Rivero a kol. 1998). Naopak vlákna II. typu jsou užšího průměru, obsahují vyšší hladinu myozinové ATPázy, energeticky využívají hlavně svalový glykogen a vykazují rychlejší a intenzivnější kontrakci i regeneraci, z čehož plyne také jejich rychlejší unavitelnost (Bottinelli a Reggiani 2000). Pro tyto jejich vlastnosti se vlákna I. typu často označují jako pomalá, červená nebo oxidativní zatímco vlákna II. typu jako rychlá, bílá nebo glykolytická.

Jednotlivé kosterní svaly jsou složeny z obou základních typů vláken a liší se mezi sebou poměrem jejich zastoupení, který je ovlivněn jak geneticky tak trénovaností svalu (Gollnick a kol. 1972, Simoneau a Bouchard 1995, Kernell a kol. 1998). Například záďové svaly zajišťující vzpřímené držení těla a dýchání nebo svaly dolních končetin využívané při chůzi (mezi něž patří i musculus soleus sledovaný v této práci) sestávají zejména z pomalých vláken, což jim umožňuje dlouhodobé kontrakce bez vyčerpání energetických zásob (Gupta a kol. 1989). Naopak svaly, u nichž je pro jejich funkci zásadnější rychlost a intenzita kontrakce nežli vytrvalost, jsou složeny převážně z bílých vláken (Soukup a kol. 2002). Mezi ně patří svaly okohybné nebo svaly zapojené do pohybů prstů, které v předkládané práci reprezentuje musculus extensor digitorum longus.

Podle současných poznatků je úbytek hmoty kosterní svaloviny u proteokatabolických stavů spojen především s aktivací proteolýzy, za kterou jsou v buňce zodpovědné čtyři proteolytické systémy: kalpainový, kaspázový, lysozomální a ubiquitin-proteazomální (UPS). Kalpains a kaspázy nepřispívají kvantitativně významně k celkové proteolýze v kosterním svalu a neúčastní se ani rozvoje proteokatabolizmu u zátěžových stavů (Attaix a Taillander 1998). Ohledně významu lysozomálního systému nepanuje jednotný názor. Větší část autorů je však toho mínění, že lysozomální enzymy (katepsiny) primárně degradují endocytované proteiny a na odbourávání intracelulárních bílkovin (včetně bílkovin kosterního svalstva), se podílí menšinově (Bechet a kol. 2005). V případě UPS naopak panuje názorový konsenzus. UPS je považován za hlavního zprostředkovatele zvýšené degradace proteinů, rozvoje negativní proteinové bilance a následné svalové kachexie u většiny patologických stavů. Jeho aktivace byla zaznamenána v proteokatabolických stavech vyvolaných například u sepsí (Voisin a kol. 1996, Chai a kol. 2003), popálenin (Fang a kol. 1998, a).

1.2 Ubiquitin-proteazomální systém (UPS)

UPS je hlavní proteolytický systém organismu. Jeho základem je 26S proteazomální komplex, který vykazuje proteolytickou aktivitu. Mimo to UPS zahrnuje řadu jiných složek (převážně enzymů) bez proteolytické aktivity, které různými mechanismy a na různých úrovních regulují činnost celého systému ve smyslu kvantitativním i kvalitativním.

1.2.1 Struktura 26S proteazomálního komplexu

V savčích buňkách je UPS primárně lokalizován v cytosolu. Samotný proteazomální komplex byl však identifikován také v endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně či jádře a to v různých množstvích v závislosti na typu sledované buňky (Wojcik a DeMartino 2003). Výkonnou proteolytickou jednotkou UPS je komplex 26S proteazomu. Sestává z 20S jádra a jednoho až dvou 19S regulačních jednotek (obr. 1).

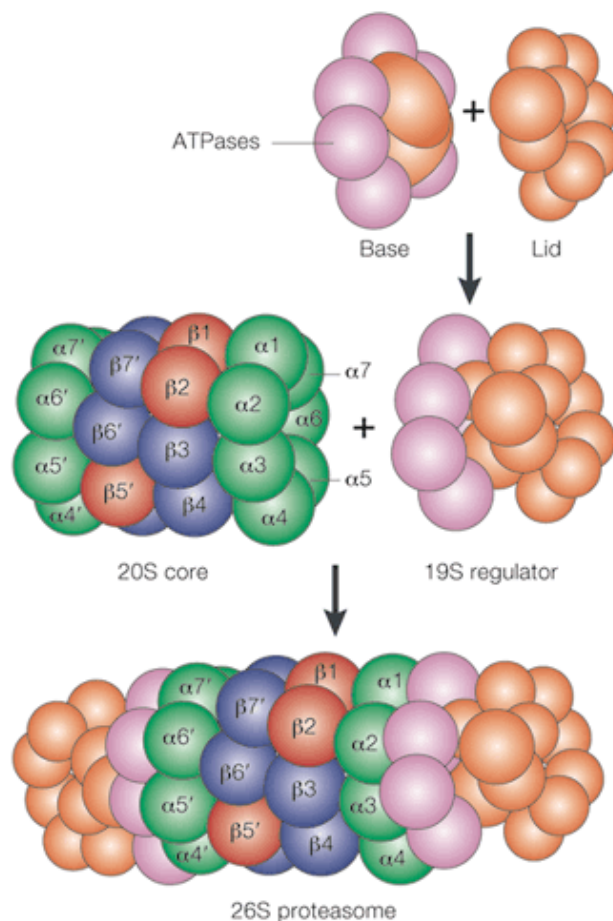
1.2.1.1 20S jádro proteazomálního komplexu

20S jádro proteazomu je tvořeno čtyřmi na sebe naléhajícími kruhy, jejichž střed představuje dutinu, v níž dochází k degradaci proteinů. Kruhy sestávají ze sedmi různých podjednotek. Vnější kruhy jsou tvořeny podjednotkami $\alpha 1 - \alpha 7$, vnitřní analogicky podjednotkami $\beta 1 - \beta 7$. Zatímco α podjednotky slouží zejména jako bariéry mezi proteolyticky aktivní dutinou proteazomu a okolím a také jako vazebná místa pro 19S regulační komplexy, β podjednotky jsou nositeli aktivního, proteolytického místa, které obsahuje terminální threonin (hydroxylová aminokyselina) sloužící jako katalytické místo pro nukleofilní atak a následnou degradaci proteinů. Dosud bylo popsáno pět proteolytických aktivit proteazomu. Chymotrypsinová – CHTLA (štěpí proteiny v místech za hydrofobními aminokyselinami), trypsinová (štěpí za bazickými aminokyselinami), kaspázová (za acidickými aminokyselinami) a dvě minoritní aktivity preferenčně štěpící proteiny v místech sousedících s větvenými respektive malými neutrálními aminokyselinami (Orlowski a kol. 1993). Krystalografickou analýzou se podařilo první tři stěžejní degradační aktivity přesně lokalizovat. Konkrétně chymotrypsinová aktivita je charakteristická pro $\beta 5$ podjednotky, trypsinová pro $\beta 2$ podjednotky a kaspázová pro podjednotky $\beta 1$ (Groll a kol. 1999).

1.2.1.2 19S regulační jednotky proteazomálního komplexu

19S regulační jednotka sestává z tzv. víčka a ze základní struktury složené z osmi podjednotek, z nichž šest vykazuje ATPázovou aktivitu. Hlavní funkcí této struktury je linearizovat složené proteiny určené k degradaci a propouštět je do proteolytického prostoru 20S proteazomu, což je ATP-dependentní proces (Pickart a Cohen 2004). Proteiny určené k degradaci (konjugované s polyubiquitinovým řetězcem-viz níže, kapitola 1.2.2.1) jsou rozpoznávány a zachytávány již zmiňovaným víčkem tvořeným

devíti podjednotkami s vysokou vazebnou afinitou k ubiquitinu (Braun a kol. 1999). Bylo by však nesprávné chápat 19S regulační jednotku jen jako strukturu sloužící k prezentaci ubiquitovaných proteinů 20S proteazomu. Víčko 19S regulačního komplexu obsahuje i podjednotky vykazující deubiquitinační aktivitu, čímž umožňuje degradaci proteinu ve 20S jádře, která by neproběhla, pokud by cílový protein zůstal ubiquitován (Voges a kol. 1999). Význam deubiquitinace dokládá fakt, že v lidském genomu bylo identifikováno 95 genů kódujících potenciální deubiquitinační enzymy (Nijman a kol. 2005). V neposlední řadě pak *in vitro* experimenty prokázaly, že proteolytická aktivita samotného 20S proteazomu je nesrovnatelně nižší oproti komplexu 26S, což jasně ukazuje důležitost interakce 20S a 19S podjednotky pro efektivní proteolýzu (Hoffman a Rechsteiner 1994).



Obrázek 1. Schematický náčrt 26S proteazomálního komplexu. Převzato z publikace Kloetzel 2001.

1.2.2 Mechanismus degradace proteinů ubiquitin-proteazomálním systémem

1.2.2.1 Ubiquitin – determinant proteinů pro degradaci v UPS

Na počátku degradace proteinu proteazomem je jeho polyubiquitinace. Ubiquitin, který v organismu funguje jako degradační marker, je malý protein obsahující 76 aminokyselinových zbytků. Jeho struktura je vysoce konzervativní a téměř se neliší u různých živočišných druhů (Vijay-Kumar a kol. 1987). Kovalentně se váže svým C-koncem (GLY76) na ϵ -aminoskupinu lysinového zbytku cílového proteinu. Tento proces dále standardně pokračuje analogickou vazbou další molekuly ubiquitinu na ϵ -aminoskupinu lysinového zbytku LYS48 již vázaného ubiquitinu za vzniku polyubiquitinového řetězce (Ciechanover a Iwai 2004). Již v tomto bodě lze demonstrovat komplikovanou regulaci celého UPS. Spojí-li se totiž molekuly ubiquitinu na lysinovém zbytku LYS48 nebo LYS29, a vzniklý řetězec obsahuje alespoň čtyři molekuly ubiquitinu, slouží tento polymer jako signál k degradaci proteinu, na němž je navázán (Thrower a kol. 2000). Avšak polyubiquitinace přes LYS63 aktivuje transkripční faktory (Weissman 2001), monoubiquitinace zase předurčuje protein k endocytóze (Hicke 2001).

1.2.2.2 Mechanismus polyubiquitinace

Polyubiquitinace substrátu začíná aktivací karboxylové skupiny GLY76 ubiquitinu ubiquitin aktivujícím enzymem (E1). Aktivovaný ubiquitin je schopen vazby na cysteinové aktivní místo ubiquitin konjugačního proteinu (E2), který pak většinou v součinnosti s ubiquitin-protein ligázou (E3) zprostředkuje vazbu ubiquitinu na cílový protein výše popsaným způsobem. E2 a zejména E3 enzymy rozeznávají specifické proteiny jež mají být ubiquitinovány. Genová analýza eukaryotních buněk, která odhalila jen několik E1 enzymů, desítky E2 enzymů a stovky E3 enzymů (Semple a kol. 2003), tak dokumentuje další způsob, jímž je UPS regulován v zájmu dosažení cílené, specifické proteolýzy.

1.2.2.3 Polyubiquitinace jako substrátově specifický proces

Základní rys odlišující UPS od ostatních proteolytických systémů je schopnost cílené degradace konkrétních proteinů. Zatímco 26S proteazom jako výkonná složka systému je ve své podstatě nespecifický (viz výše, kapitola 1.2.1.1), UPS jako celek je schopen vysoce specifické proteolýzy. Je tomu tak zejména díky velkému

množství E3 ligáz, z nichž každá ubiquitínuje jen určitý typ proteinů. Podle současných informací existují dokonce E3 ligázy, u nichž je znám pouze jediný substrát. Dosud identifikované E3 ligázy dělíme do dvou základních skupin, HECT a RING ligázy, podle charakteristických proteinových domén v jejich struktuře.

1.2.2.3.1 HECT E3 ligázy

Do této skupiny spadají E3 ligázy obsahující na C-konci svého peptidového řetězce typickou strukturu, která se označuje jako HECT doména. Ta má na svém N-konci vazebné místo pro E2 konjugační enzymy, na C-konci pak cysteinové aktivní místo pro thiolesterovou vazbu s ubiquitinem (Scheffner a kol. 1995). Jednotlivé enzymy této skupiny se označují podle zkratky pro rozpoznávací místo pro cílový protein. Známe tak například E3 ligázy E6AP nebo Mule/ARF-B51, Smurf1 nebo Smurf2, Itch ubiquitínující tumor supresor p53 (Gallagher a kol. 2006), receptor TGF- β (Izzi a Attisano 2006) respektive protein JunB (Gao a kol. 2004) a mnohé další.

1.2.2.3.2 RING E3 ligázy

Tyto enzymy se od HECT E3 ligáz liší zejména tím, že ve svém aktivním místě mají hojně zastoupeny aminokyseliny cystein a histidin, jež nekovalentně váží kovové kationty a ubiquitin při přenosu na cílový protein pouze prostorově orientují, aniž by se na něj přímo vázaly (Joazeiro a Weissman 2000). Mezi jejich zástupce řadíme například VHL, POSH nebo TRAF6, jejichž cílové proteiny pro ubiquitinaci jsou HIF-1 α (Ivan a kol. 2001), HIV Gag (Alroy a kol. 2005) respektive NF- κ B – nukleární faktor κ B (Deng a kol. 2000). Mezi RING E3 ligázy patří rovněž MuRF1 (muscle RING finger 1) a atrogin1/MAFbx (muscle atrophy F-box). Ačkoli jejich substrátová specifita není dosud známa, zvýšená exprese těchto E3 ligáz byla zaznamenána při proteokatabolických stavech v kosterních svalech (Bodine a kol. 2001, Gomes a kol. 2001).

1.3 Degradace proteinů kosterního svalstva u proteokatabolických stavů - význam UPS

Kosterní svalovina tvoří 30-50 % tělesné hmotnosti člověka a představuje hlavní zdroj aminokyselin pro potřeby obranných reakcí organismu u většiny patologických stavů. Proteiny kosterní svaloviny jsou proto primárním cílem patologickým stavem aktivovaných proteolytických systémů, mezi nimiž hraje stěžejní roli UPS.

1.3.1 Humorální reakce organismu ve stavech spojených s úbytkem svalové hmoty

Aktivace UPS a proteolýzy v kosterní svalovině byla pozorována v mnohých stavech spojených s jejím progresivním úbytkem. Byla popsána například u sepse (Voisin a kol. 1996), rozsáhlých popálenin či jiných závažných traumat (Chai a kol. 2002), onkologických onemocnění (Bossola a kol. 2003) nebo renálních selhání (Bailey a kol. 1996). Skutečnost, že takto různorodé stavy jednotně indukují UPS zprostředkovanou svalovou proteolýzu, naznačuje, že se v jejich průběhu aktivují stejné nebo podobné mechanismy, v jejichž důsledku ke stimulaci UPS dochází. Společným rysem výše jmenovaných stavů je například zvýšená exprese některých katabolických hormonů a cytokinů. Jedná se zejména o tumor nekrotický faktor α (TNF- α), interleukin 1β (IL- 1β), proteolýzu indukující faktor (PIF) nebo glukokortikoidy.

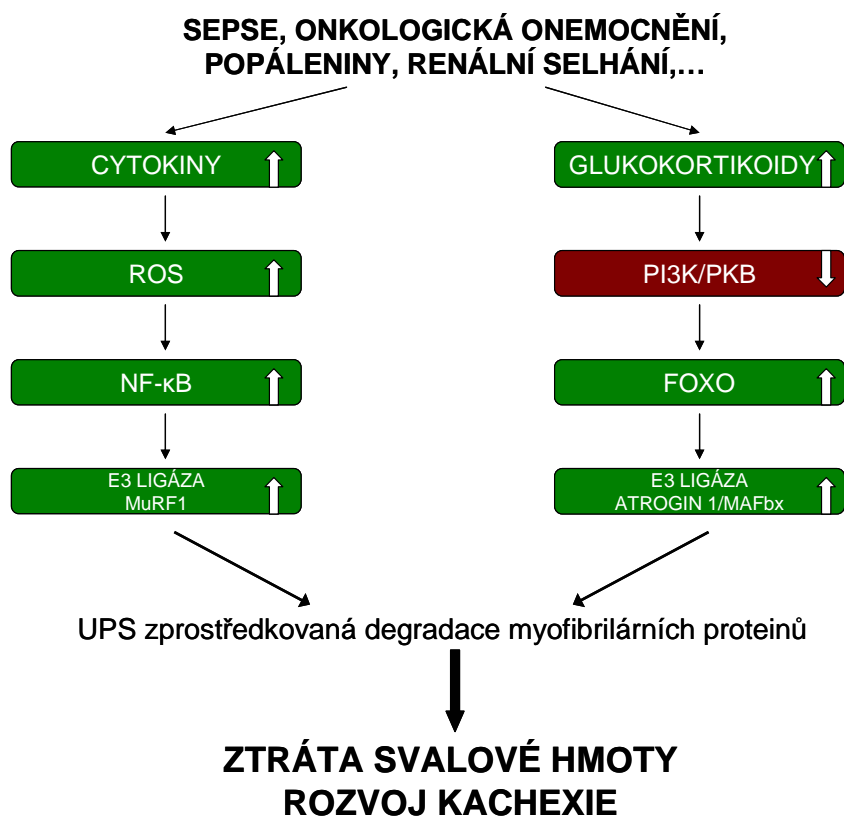
1.3.2 Aktivace UPS v proteokatabolickém stavu na molekulární úrovni

Jedním z účinků výše jmenovaných cytokinů je stimulace produkce reaktivních kyslíkových částic (reactive oxygen species – ROS) pravděpodobně cestou aktivace NADPH oxidázy (Chenevier-Gobeaux a kol. 2006). ROS jsou účinnými aktivátory NF- κ B (Sulciner a kol. 1996). Aktivovaný NF- κ B poté iniciuje zvýšenou expresi MURF1 (Cai a kol. 2004).

V případě glukokortikoidů je aktivační dráha UPS odlišná, nicméně výsledek – ztráta svalových bílkovin – stejný. Glukokortikoidy mimo jiné způsobují inhibici jedné z hlavních buněčných signálních cest označované jako phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B – PI3K/PKB (Singleton a kol. 2000). Inhibice PI3K/PKB vede ke snížené fosforylaci transkripčních faktorů FOXO – forkhead box transcription factors O – (Link a kol. 2009), což zvyšuje jejich transkripční aktivitu a vede k indukci exprese atroginu1/MAFbx (Kamei a kol. 2004), který společně s MuRF1 představuje E3 ligázy, jejichž exprese je charakteristiky zvýšená v kosterním svalů při patologicky aktivované proteolýze (viz výše, kapitola 1.2.2.3.2).

Molekulární mechanismy aktivující UPS zprostředkovanou degradaci svalových proteinů jsou podrobně popsány a diskutovány v několika přehledových pracích (Du a kol. 2005, Kandarian a Jackman 2006, Nury a kol. 2007, Tisdale 2007). Výše

zmíněná fakta a jejich grafické znázornění na obrázku 2 demonstrují zásadní roli UPS v odbourávání proteinů kosterní svaloviny za patologických podmínek a tedy význam inhibitorů proteazomu jako potenciálních terapeutik kachexie různé etiologie.



Obrázek 2. Aktivační cesty myofibrilární degradace v proteokatabolickém stavu. ROS – reactive oxygen species, PI3K/PKB - phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, NF-κB – nuclear factor-κB, FOXO - forkhead box transcription factors O, MuRF1 - muscle RING finger 1, MAFbx-muscle atrophy F-box, UPS – ubiquitin-proteazomální systém.

1.4 Inhibitory proteazomální degradace

Za objev UPS a výzkum objasňující jeho význam jako hlavního proteolytického systému v organismu získali v roce 2004 Aaron Ciechanover, Avram Hershko a Irwin Rose Nobelovu cenu za chemii. Dosud byla prokázána zásadní role UPS při prezentaci povrchových antigenů (Rock a Goldberg 1999), regulaci buněčného cyklu (Mayer 2000) nebo intracelulární signalizaci (Hosler a kol. 2006). Farmakologické ovlivnění aktivity UPS tak představuje potenciální možnosti léčby celé řady onemocnění. Již bylo objeveno mnoho inhibitorů aktivity UPS se značnou diverzitou v biologických účincích. Zlom nastal v druhé polovině devadesátých let minulého století, kdy byly zjištěny protirakovinné účinky bortezomibu (Adams a kol. 1999), který se následně stal prvním klinicky testovaným inhibitorem proteazomu (IP)

a dnes je standardně nasazován v terapii recidivujícího mnohočetného myelomu. Tato skutečnost způsobila, že většina výzkumu v oblasti IP je nyní soustředěna na problematiku nádorových onemocnění. Méně pozornosti už je věnováno jiným možnostem využití IP, mezi něž patří i mírnění nadměrných ztrát svalové hmoty v důsledku závažných onemocnění.

Naprostá většina látek snižujících proteolýzu indukovanou aktivací ubiquitin-proteazomálního systému interaguje s 20S proteazomem. Inhibitory proteazomu však mají jisté limity vycházející zejména z jejich (ne)selektivity a (ne)specifity. Proto se hledají a vyvíjí inhibitory, které by redukovali proteolýzu na vyšší úrovni ještě před její finální fází, která probíhá v proteazomu. Z tohoto pohledu patří k nejperspektivnějším inhibitory E3 ligáz, jak je uvedeno v kapitole 1.3.2.

1.4.1 Inhibitory proteazomu

1.4.1.1 Přehled inhibitorů proteazomu

Inhibitory proteazomu jsou strukturně velmi rozmanitou skupinou látek. Obvykle se dělí na IP přírodního a syntetického původu. Toto základní dělení je využito i v následujícím textu, kde je v tabulce 1 a 2 uveden stručný přehled dnes známých IP. V rámci každé tabulky jsou pak jednotlivé konkrétní látky rozděleny do podskupin na základě chemické struktury, která determinuje mechanismus jejich účinku.

Tabulka 1. Přehled inhibitorů proteazomu přírodního původu.

Strukturní charakteristika	Příslušné IP	Selektivita (specifita)	Zdroj	Literatura
peptidické aldehydy	tyropeptin A; fellutamid B	20S proteazom (β 5)	Kitasatospora MK993-dF2; Penicillium fellutatum	Momose a kol. 2005; Hines a kol. 2008
peptidické epoxoketony	epoxomycin; eponemycin; TMC-86, 89, 96	20S proteazom	Streptomyces sp.	Kisselev a Goldberg 2001
lineární polypeptidy	PR-39	20S proteazom (α 7)	střevní stěna vepřového dobytka	Gao a kol. 2000; Gaczynska a kol. 2003
peptidické laktony	laktacystin; belaktosin A, C; salinosporamide A; omuralid	20S proteazom, katepsin A	Streptomyces sp., Salinospora tropicana	Ostrowska a kol. 2000; Omura a kol. 1991; Asai a kol. 2004
cyklické peptidy	TMC-95A; argyirin A	20S proteazom	Apiospora montagnei; Archangium gephyra	Koguchi a kol. 2000; Nickeleit a kol. 2008
komplikované struktury	syringolin A; glibobactin	20S proteazom	Pseudomonas syringae; Burkholderia pseudomallei	Groll a kol. 2008
triterpeny	celastrol	20S proteazom (β 5)	Tripterygium wilfordii	Yang a kol. 2006
steroidy	withaferin A	20S proteazom (β 5)	Withania somnifera	Yang a kol. 2007
antrachinony	hypericin	20S proteazom	Hypericum sp.	Pajonk a kol. 2005
piperaziny	gliotoxin	20S proteazom	houby	Kroll a kol. 1999
polyfenoly	epigalaktokatechin galát	20S proteazom (β 5)	zelený čaj	Landis-Piwowar a kol. 2007; Dou a kol. 2008

Tabulka 2. Přehled syntetických a semisyntetických inhibitorů proteazomu.

Strukturní charakteristika	Příslušné IP	Selektivita (specifita)	Modelový (výchozí) IP	Literatura
peptidické aldehydy	MG-132; MG-115; PSI; CEP-1612; inhibitor kalpainu I, II; leupeptin; TP-110	20S proteazom; katepsiny; kalpainy	tyropeptin A (pouze u TP-110)	Kisselev a Goldberg 2001; Braun a kol. 2005; Iqbal a kol. 1995; Iijima a kol. 2009 Palmer a kol. 1995;
peptidické vinylsulfony	AdaAhx3L3VS; ZL3VS; NLVS; Ac-PRLNVS	20S proteazom; katepsiny		Kessler a kol. 2001; Bogyo a kol. 1997; van Swieten a kol. 2007; Nazif a kol. 2001
peptidické boronáty	PS-341 (bortezomib); MLN-273; MG-262	20S proteazom ($\beta 5$)	MG-132	Adams a kol. 1998; Kisselev a kol. 2006;
peptidické polyoxyetyleny	PEG-Arg-Val-Arg-H; PEG-Leu-Leu-Nle-H	20S proteazom ($\beta 2$, $\beta 5$)	inhibitor kalpainu 1	Loidl a kol. 1999
peptidické laktony	laktacystin; MLN-519; belaktosin A, C	20S proteazom, katepsin A	laktacystin	Corey a kol. 1999; Ostrowska a kol. 2000
peptidické bifenyly	BIA-1a; BIA-2a; BIA-2b	20S proteazom ($\beta 2$)	TMC-95A; Ac-PRLNVS	Groll a kol. 2006
peptidické epoxoketony	PR-171 (carfilzomib); dihydroeponemycin; YU-101	20S proteazom ($\beta 5$)	epoxomycin; eponemycin	Kuhn a kol. 2007; Demo a kol. 2007
lineární polypeptidy	PR-11	20S proteazom ($\alpha 7$)	PR-39	Anbanandam a kol. 2008
cyklické peptidy	makrocyclický TMC-95A	20S proteazom	TMC-95A	Berthelot a kol. 2003
triterpeny	deriváty k. betulinové	20S proteazom		Huang a kol. 2007
jiné struktury	disulfiram; tetraakridin	20S proteazom; topoizomeráza II		Lövborg a kol. 2006; Vispé a kol. 2007

1.4.1.2 Mechanismus účinku inhibitorů proteazomu

Naprostá většina IP interaguje s aktivním místem β podjednotek proteazomu, které obsahuje terminální threonin. Mechanismus inhibice je v těchto případech závislý na chemické struktuře látky respektive na charakteru funkční skupiny schopné reagovat s threoninovým hydroxylem. Výsledkem interakce může být buď vratná (reverzibilní) nebo nevratná (ireverzibilní) inhibice proteazomu.

1.4.1.2.1 Aldehydické inhibitory proteazomu

IP s aldehydickou funkční skupinou tvoří s hydroxylovou skupinou terminálního threoninu hemiacetalovou vazbu, která je za fyziologických podmínek vratná. Reverzibilitnost reakce jako obecně pozitivní vlastnost jakéhokoliv inhibitoru je však v případě aldehydických IP zastíněna jejich velmi nízkou selektivitou. I ta je důsledkem aldehydové skupiny jakožto struktury velmi reaktivní. IP však sestávají nejen z funkční skupiny ale i z dalších, nejčastěji peptidických, struktur, které již sice přímo nesouvisí s mechanismem inhibice, o to více však ovlivňují selektivitu a specifitu konkrétních IP. Příkladem může být leupeptin, jeden z prvních aldehydických IP, který je téměř univerzálním inhibitorem katepsinů, kalpainů, proteazomu i dalších proteáz. Modifikacemi jeho peptidických řetězců se podařilo vyvinout mimo jiné inhibitor PSI s výraznou selektivitou vůči proteazomu a dokonce specifitou pro $\beta 5$ proteazomální podjednotku. Podobné příklady lze nalézt také mezi IP přírodního původu, což dokazují proteazom-selektivní, $\beta 5$ specifické aldehydické IP jako tyropeptin A nebo fellutamid B.

1.4.1.2.2 Vinylsulfonové inhibitory proteazomu

Další skupina IP, vinylsulfony, reaguje s hydroxylem terminálního threoninu β podjednotek za vzniku éterové, kovalentní a tedy nevratné vazby. To sice předem diskvalifikuje IP této skupiny pro klinické použití, na druhou stranu z nich dělá ideální látky pro laboratorní výzkum v oblasti ubiquitin-proteazomálního systému. Stejně jako aldehydické IP, i vinylsulfonové deriváty se však potýkají s nízkou mírou selektivity. Řešením je opět modifikace peptidových řetězců. Například Kessler a kol. (2001) zjistili významné zvýšení selektivity při prodloužení peptidové části struktury inhibitoru a její modifikací také dosáhli u látky AdaAhx3L3VS přibližně stejné míry účinku na jednotlivé proteolytické aktivity proteazomu. Podobně byl syntetizován $\beta 5$ preferenční NLVS nebo $\beta 1$ specifické fenolické vinylsulfony. Ač strukturně zcela

odlišné, sdílí s vinylsulfony stejný způsob interakce s proteazomem například syringolin A nebo glibobactin.

1.4.1.2.3 Boronátové inhibitory proteazomu

V současné době jsou z klinického hlediska nejdiskutovanější a nejnámennější peptidické boronáty. Prázdný orbital atomu bóru totiž tvoří s threoninovým hydroxylem β podjednotek proteazomu velmi stabilní avšak za fyziologických podmínek reverzibilní tetrahedrální komplex a kombinuje tak v sobě výhody obou výše zmíněných mechanismů. Přidá-li se výrazná β 5 specifita, která je pro tuto skupinu IP charakteristická, není divu, že například bortezomib má dnes již stabilní pozici v klinické praxi. Ani zde však nelze opomenout podstatnou roli peptidických řetězců, kterou dokumentuje zejména fakt, že deriváty kyseliny borité s krátkými (dipeptidickými) nebo žádnými řetězci zcela ztrácí selektivitu účinku.

1.4.1.2.4 Laktonové inhibitory proteazomu

Skupina laktonových derivátů tvoří s threoninovým hydroxylem proteazomu ireverzibilní esterovou vazbu. To laktonové IP z hlediska potenciálu využití staví zhruba na úroveň vinylsulfonů, proti nimž mají výhodu výrazně vyšší inhibice proteazomu při nižších použitých koncentracích. Naopak nevýhodou jsou vyšší pořizovací náklady způsobené komplikovanou syntézou či izolací z bakterií. Esterovou vazbu tvoří s threoninem také bifenyloxylové deriváty. Vlivem zcela odlišného prostorového uspořádání oproti laktonům je však tato vazba pouze přechodná a způsobená inhibice tedy vratná.

1.4.1.2.5 Epoxyketonové inhibitory proteazomu

Poslední skupinou, jejíž mechanismus účinku je založen na interakci s terminálním threoninem β podjednotek proteazomu jsou epoxoketony, které ireverzibilně tvoří s hydroxylovou skupinou threoninu velmi stabilní morfolinový cyklus. I když se přírodní epoxomycin vyznačuje solidní proteazomální selektivitou, jeho semisyntetické deriváty, zejména YU-101, jsou navíc β 5 specifické a potvrzují tak důležitost vedlejších struktur pro účinky IP.

1.4.1.2.6 Ostatní inhibitory proteazomu

V tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny i skupiny IP, jejichž inhibiční efekt na aktivitu proteazomu byl sice experimentálně prokázán, ale mechanismus účinku je buď

neznámý nebo v rovině spekulací. Příkladem mohou být cyklické peptidy, jejichž struktura znemožňuje vstup do proteazomu a přímou interakci s proteolytickými β podjednotkami. Uvažuje se tedy o mnohačetných hydrofobních interakcích, v jejichž důsledku dojde buď k zablokování vstupu substrátu do proteazomu nebo k ovlivnění interakce 20S proteazomu s 19S regulačním komplexem. Zajímavé však je, že tyto sloučeniny vykazují poměrně vysokou selektivitu a β 5 specifitu, což předpokládá i specifický mechanismus účinku. Také lineární peptid PR 39, přestože by teoreticky mohl ovlivňovat aktivní místa na β podjednotkách proteazomu, se váže na α 7 podjednotku proteazomu a komplikuje zřejmě vstup substrátu do proteazomu. V případě polyoxyetylenů jsou zase pravděpodobným nositelem účinku koncové, proteazomem neštěpitelné, peptidické řetězce, zatímco samotná polyoxyetylenová kostra plní pasivní funkci na míru syntetizovaného můstku mezi inhibovanými podjednotkami. Podobná situace se předpokládá i u triterpenických IP, kde byl dokonce v případě nemodifikované kyseliny betulinové prokázán opačný (stimulační) efekt na proteazom.

1.4.2 Inhibitory proteazomální degradace neovlivňující proteazom

Jedná se o látky ovlivňující regulační mechanismy UPS, zejména pak proces ubiquitinace a deubiquitinace proteinů. Podle cílové struktury dnes rozeznáváme E1 inhibitory (např. deriváty benzothiazolu) nebo inhibitory deubiquitinačních enzymů (kurkumin, dibenzilidenaceton). Logicky největší pozornost výzkumníků však přitahují inhibitory E3 enzymů. Náleží do ní například deriváty benzoxadiazolu (inhibice TRAF6=E3 specifická pro NF- κ B) nebo deazaflavinu (inhibice MDM2=E3 specifická pro p53 protein). E3 inhibitory by mohly v kombinaci s IP přinést efektivnější inhibici proteolýzy eventuelně IP i nahradit. Podrobnější informace o těchto látkách jsou shrnuty v publikaci Guédat a Colland 2007.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavní cíle předkládané disertační práce jsou:

- zavést vhodný model proteokatabolického stavu u laboratorního potkana a zhodnotit jeho dopad na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů
- získat informace o účinku nových inhibitorů proteazomu na bázi homobelaktosinu C na metabolismus proteinů a aminokyselin v kosterních svalech intaktních potkanů
- posoudit účinky bortezomibu, jako nejznámějšího IP, na metabolismus proteinů a aminokyselin v kosterních svalech u potkanů v proteokatabolickém stavu

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Experimentální zvířata

Veškeré experimenty byly provedeny na samcích laboratorních potkanů kmene Wistar (BioTest, Konárovice, ČR) chovaných v kontrolovaných podmínkách (12-ti hodinový světelný cyklus, 22 °C, 55-65% vlhkosti), s volným přístupem k vodě a potravě. Použitá zvířata o průměrném stáří tři týdny vážila 35-65 g a nebyla separována od matky. Nízká hmotnost zvířat umožnila izolaci malých svalů, které byly vyhovující z hlediska výměny dýchacích plynů, živin, katabolitů a biologicky aktivních látek mezi buňkami a inkubačním médiem. Plány experimentů byly vždy schváleny Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání Univerzity Karlovy v Praze, Lékařské fakulty v Hradci Králové.

3.2 Materiál

Belaktosin A a C syntetizovali Armin de Meijere a Oleg Larionov na Georg-August University v Goettingenu (Germany). Bortezomib (Velcade™) pro naše experimenty věnovala Janssen-Cilag spol. s r. o. (Praha, Česká republika). Cykloheximid, jednotlivé aminokyseliny, Folin-Ciocalteu činidlo, albumin, dimethylsulfoxid, terpentýnový olej, lipopolysacharidy E. coli 0127:B8 (endotoxin), N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylkumarin (Suc-LLVY-MCA), N-Cbz-Phe-Arg-7-amido-4-methylkumarin hydrochlorid (Z-FA-MCA), N-Cbz-Phe-Phe-fluoromethyl keton (Z-FF-FMK) a 7-amino-4-methylkumarin (AMC) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), HPLC eluent, 6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát, fluorescamin a další chemikálie pro potřeby HPLC od firmy Waters (Milford, MA, USA) a L-[1-¹⁴C]leucin od Amersham International (Buckinghamshire, UK). Aminoplasmal 15 dodala firma B. Braun Medicals (Melsungen, Germany), hyamin Packard Instruments (Meriden, CT, USA), Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG132) firma Biomol (Hamburg, Germany) a osmotické pumpy 2001D firma Alzet Osmotic Pumps (Cupertino, CA, USA). Ostatní chemikálie byly zakoupeny od firem Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) a Lachema (Brno, Česká republika).

3.3 Izolace kosterních svalů potkana

Izolace musculus soleus (SOL) a musculus extensor digitorum longus (EDL) z obou zadních končetin probíhala v celkové anestézii pentobarbitalem podaným intraperitoneálně v dávce 4-7mg/100g tělesné hmotnosti.

Potkana jsme fixovali na operační stolek (obr. 1, příloha 1). Po dezinfekci operačního pole jsme nastříhli břišní stěnu tak, abychom mohli snadno manipulovat s vnitřními orgány a bylo možné odkrýt břišní bifurkaci aorty. Z bifurkace jsme odebrali maximální množství krve pomocí sterilní stříkačky s jehlou (obojí předem propláchnuté heparinem). Tímto způsobem jsme získali vzorky krve a současně usmrtili zvíře.

Odstranili jsme kůži z obou končetin tak, abychom odkryli svalovinu od kotníků do poloviny stehen (obr. 2, příloha 1). Následovalo odstranění povrchové fascie m. tibialis anterior a nastřížení retinaculum flexorum, čímž jsme uvolnili distální šlachy m. tibialis anterior a EDL.

Po této přípravné preparaci jsme maximálně flektovali zadní končetiny v kyčelních kloubech a lepící páskou je fixovali k operačnímu stolku. Tímto jsme si usnadnili přístup ke svalům zadní části lýtká. Odstranili jsme povrchovou fascii, podvázali Achillovu šlachu (obr. 3, příloha 1), co nejdistaněji ji přestříhli a tahem za ni směrem ke stolku jsme uvolnili SOL a m. gastrocnemius. Svaly jsme odtahovali pomocí peanu tak dlouho, než se odkryla proximální šlacha SOL. Tuto jsme podvázali a přestříhli. Tahem jsme SOL oddělili od m. gastrocnemius a přestřížením distální šlachy jej zcela izolovali (obr. 4, příloha 1).

Po vyjmutí obou lýtkových svalů jsme končetiny fixovali rovnoběžně s ocasem, podvázali distální šlachu m. tibialis anterior, přestříhli a sval tahem od stolku odtrhli. Tímto jsme odkryli EDL včetně jeho proximální šlachy (obr. 5, příloha 1). Obě šlachy EDL jsme podvázali, přestříhli a sval izolovali.

3.4 Inkubace izolovaných svalů

Izolované svaly jsme ihned po vyjmutí ponořili do chlazeného (4°C) fyziologického roztoku a přímo v něm je pomocí podvazů navázali na inertní drátek pod napětím, které přibližně odpovídá klidovému tenzi svalů v organizmu (Maizels a kol. 1977)

(obr. 6, příloha 1). Připravené svaly jsme umístili do inkubačních lahvíček (obr. 7, příloha 1), které obsahovaly 2,5 ml modifikovaného Krebsova – Heinseleitova pufru (tab. 3) o pH 7,4, nasyceného plynou směsí 95 % O₂ a 5 % CO₂ (karbogen) a vytemperovaného ve vodní lázni na 37 °C. Po uzavření lahvíček jsme médium karbogenem dosytili.

Tabulka 3. Složení modifikovaného Krebsova – Heinseleitova pufru.

Látka	Koncentrace mmol/l
Na ⁺	144
K ⁺	4,2
Mg ²⁺	0,8
Ca ²⁺	1,3
Cl ⁻	122,8
HCO ₃ ⁻	26
SO ₄ ²⁻	0,8
H ₂ PO ₄ ⁻	2
Insulin	2 mU/ml
Glukóza	6
Aminokyseliny*	3,5
L-[1- ¹⁴ C]leucin*	0,6 µCi/ml
Cykloheximid [†]	0,5

* - v médiu pouze při měření proteosyntézy a oxidace leucinu. † - v médiu pouze při měření proteolýzy.

Preinkubace probíhala ve vodní třepací lázni (80 cyklů/min) třicet minut za účelem adaptace svalů a stabilizace inkubačních podmínek. Poté jsme svaly přemístili do nové lahvičky, kde proběhla inkubace za identických podmínek. Viabilita takto izolovaných a inkubovaných svalů byla potvrzena jak v naší laboratoři (Safranek a kol. 2003, a), tak jinými autory (Fang a kol. 2005).

3.5 Proteosyntéza a oxidace leucinu v izolovaných svalech

Proteosyntézu a oxidaci leucinu jsme měřili zároveň v jednom svalu. Médium pro inkubaci jsme obohatili o směs aminokyselin (Aminoplasma 15%, glutamin a tyrosin) o celkové koncentraci 3,5 mmol/l tak, aby výsledné koncentrace přibližně odpovídaly plazmatickým (tab. 4). Tím jsme dodali základní substrát pro proteosyntézu a zajistili stabilní koncentrace aminokyselin v médiu i ve svalu. Dále jsme přidali L-[1-¹⁴C]leucin v dávce 0,6µCi/ml. Pod uzávěry skleněných lahvíček určených pro inkubaci byly umístěny kelímky tak, aby se nedotýkaly stěny lahvičky ani uzávěru (obr. 8, příloha 1).

Celková délka inkubace svalu byla 60 minut. Zkrácený interval inkubace oproti proteolýze byl zvolen za účelem minimalizace zpětného rozkladu syntetizovaných proteinů. Přesně po uplynutí této doby jsme kelímky naplnili 0,4 ml hyaminu. Metabolismus svalu jsme zastavili vstříknutím 0,2 ml 35% HClO₄ do inkubačního média. Okyselení média zároveň způsobilo vytěsnění rozpuštěného CO₂. Inkubační lahvičky jsme 60 min třepali při pokojové teplotě, aby došlo k vyvázání CO₂ do hyaminu. Po tomto intervalu jsme vyjmuli centrální kelímky s hyaminem a svaly.

Hyamin v centrálním kelímku během hodiny (tento interval potřebný k vyvázání veškerého uvolněného CO₂ byl experimentálně stanoven při zavádění této metody v naší laboratoři) vyvázal CO₂ přítomný v inkubační lahvičce včetně ¹⁴CO₂, který je produktem oxidace L-[1-¹⁴C]leucinu. Množství vyvazaného ¹⁴CO₂ jsme kvantifikovali na scintilačním detektoru LS 6000 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) a s použitím specifické aktivity leucinu vyjádřili jako množství oxidovaného leucinu v nmol leucinu/g svalu/hod.

Svaly jsme opláchli v 6% HClO₄, osušili a stiskli Wollenbergovými kleštěmi předmraženými v tekutém dusíku. Poté jsme svaly rozdrtili v tekutém dusíku, homogenizovali v 0,6 ml 6% HClO₄ a centrifugovali (12 000*g, 10 minut). V supernatantu byla stanovena radioaktivita L-[1-¹⁴C]leucinu. Sediment jsme třikrát promyli 1 ml 6% HClO₄ a uchovali při -80 °C až do zpracování.

Takto získaný sediment byl hydrolyzován při 70 °C v 4% NaOH a hydrolyzát rozdělen na dvě části. V první části vzorku byla stanovena aktivita L-[1-¹⁴C]leucinu na scintilačním detektoru. Ve druhé byla měřena koncentrace proteinů dle Lowryho (1951). Rychlost proteosyntézy byla přepočítána s použitím specifické aktivity leucinu a vyjádřena v nmol leucinu inkorporovaného do proteinů svalu/mg proteinů svalu/hod.

Tabulka 4. Zastoupení aminokyselin v inkubačním médiu při měření proteosyntézy.

Aminokyselina	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
Alanin	433
Arginin	159
Aspartát	103
Cystein	50
Fenylalanin	60
Glutamát	190
Glutamin	610
Glycin	441
Histidin	58
Isoleucin	77
Leucin	150
Lysin	403
Methionin	66
Prolin	110
Serin	219
Threonin	182
Tryptofan	18
Tyrosin	80
Valin	106
Celková koncentrace	3515

3.6 Celková a myofibrilární proteolýza v izolovaných svalech

Pro měření proteolýzy jsme do média přidávali cykloheximid (synonyma – aktidion, naramycin A) o celkové koncentraci 0,5 mmol/l, který blokuje translaci mRNA na 80S ribozomech (Obrig a kol. 1971; Suzuki a kol. 1992) a zastavuje tak proteosyntézu. V našich podmínkách jsme blokováním proteosyntézy zabránili reinkorporaci aminokyselin uvolněných při rozpadu bílkovin. Celková délka inkubace svalu byla 120 minut. Následně jsme médium centrifugovali (12 000*g, 10 minut) a uchovali při -20 °C do dalšího zpracování.

Celkovou proteolýzu jsme měřili na základě rychlosti uvolňování tyrosinu do inkubačního média. Tyrosin je aminokyselina, která není ve svalu ani syntetizována ani odbourávána a rychlost jejího uvolňování do inkubačního média při současném zablokování proteosyntézy tedy odpovídá rychlosti uvolňování tyrosinu ze všech proteinů svalu – celkové proteolýze. Výsledky byly vyjádřeny v nmol uvolněného tyrosinu na gram svalu a hodinu.

Pro kvantifikaci myofibrilární proteolýzy jsme měřili rychlost uvolňování 3-methylhistidinu (3MH) do inkubačního média. 3MH vzniká posttranslační methylací histidinu a vyskytuje se specificky v myofibrilárních proteinech – aktinu a myozinu. Při degradaci těchto bílkovin se 3MH kvantitativně vylučuje z organismu (Long a kol. 1975), což z něj činí ideální marker myofibrilární proteolýzy. Výsledky byly vyjádřeny v nmol uvolněného 3MH na gram svalu a hodinu.

3.7 Hmotnost izolovaného svalu

Jelikož rychlost proteolýzy a oxidace leucinu je vztahována na jednotku hmotnosti svalu, bylo nutné znát hmotnost inkubovaných svalů. Vážení se však ukázalo být nepřesné (např. dva identické svaly jednoho potkana se mohli lišit hmotností až o 20 % podle toho, jak dlouhé byly při izolaci ponechány šlachy). Přistoupili jsme tedy k využití vzorce pro výpočet hmotnosti svalu z hmotnosti jedince. Vzorce byly odvozeny na našem pracovišti již dříve a to na souborech přesahujících 100 vzorků (Safranek a kol. 2003, b).

$$m \text{ EDL (mg)} = (0,56x - 9,2453)$$

$$m \text{ SOL (mg)} = (0,5161x - 8,107)$$

X je hmotnost jedince v gramech.

3.8 Koncentrace aminokyselin v médiích

Médium z inkubací izolovaných svalů jsme deproteinovali přidáním 8% kyseliny sulfosalicylové se 100 $\mu\text{mol/l}$ norleucinu (vnitřní standard) v množství 0,1 ml/1 ml média. Deproteinované médium bylo následně centrifugováno (12000*g, 5 minut) a supernatant neutralizován přidávkem stejného objemu 0,2 mol/l borátového pufru o pH 8,8. Takto upravené vzorky média jsme skladovali až do analýzy při teplotě -80 $^{\circ}\text{C}$.

Analýza obsahu všech aminokyselin (mimo 3MH) v médiu byla provedena po předkolonové derivatizaci 6-aminochinolylyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamátem pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (separační modul 2695, fluorescenční detektor 2475, software Empower 2; Waters, Milford, MA, USA). Podmínky analýzy vycházely z prací Cohen a Michaud 1992 a Reverter a kol. 1997.

3MH v médiu jsme detekovali také chromatograficky avšak po derivatizaci fluorescaminem (Wassner a kol. 1980, Lowell a kol. 1986).

3.9 Chymotrypsinová aktivita proteazomu

CHTLA proteazomu jsme stanovili v izolovaných svalech po inkubaci v médiu určeném k měření proteolýzy. Po ukončení inkubace a odebrání média k analýze obsahu aminokyselin (viz výše, kapitola 3.6) jsme sval zbavili podvazů, opláchli ve fyziologickém roztoku a okamžitě vložili do mikrozkušavky s 0,4 ml chlazeného homogenizačního pufru o složení 20 mM Tris báze, 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, pH 7,5. Sval jsme ve zkumavce předstříhali a následně homogenizovali pomocí mechanického dezintegrátoru. Homogenát jsme centrifugovali 10 minut při 4 °C a 18 000*g. 0,1 ml supernatantu jsme vždy přidali jak ke stejnému objemu 100 mM Tris pufru, pH 8,0 s fluorogenním substrátem Suc-LLVY-MCA (0,1 mM) tak k témuž substrátovému roztoku obohacenému o inhibitor proteazomu MG132 (0,02 mM). Vzniklé směsi jsme ponechali 60 minut inkubovat na ledu. Následně jsme zastavili štěpení substrátu přidáním 0,4 ml 100 mM octanového pufru, pH 4,3. Fluorescenci vzorků jsme ihned odečetli při excitační vlnové délce 340 nm a emisní vlnové délce 440 nm. Kalibrační přímku jsme získali proměřením slepých vzorků s obsahem AMC (0,04-5 μM/l). Hodnotu fluorescence vzorků inkubovaných se substrátovým roztokem a MG132 jsme vždy odečetli od příslušných hodnot vzorků inkubovaných pouze se substrátovým roztokem. Proteolytickou aktivitu proteazomu jsme vyjádřili jako nmol AMC/g proteinů ve vzorku/hodinu. Obsah proteinů byl stanoven podle Lowryho (1951). Při stanovení CHTLA jsme metodicky vycházeli z publikace Gomes-Marcondes a Tisdale (2002).

3.10 Aktivita katepsinů B a L

Princip stanovení proteolytické aktivity katepsinů B a L byl shodný s principem uvedeným u CHTLA proteazomu s následujícími metodickými odlišnostmi. Sval inkubovaný 120 minut v médiu pro proteolýzu jsme vložili do 0,6 ml chlazeného homogenizačního pufru o složení 300 mM octan sodný, 4 mM EDTA, 8 mM dithiothreitol a 0,2 % Triton X-100 (v/v), pH 5,0. Po homogenizaci jsme ponechali vzorek 30 minut stát na ledu a následně centrifugovali 30 minut při 4 °C a 18 000*g. 0,01 ml supernatantu jsme vždy přidali jak k 0,2 ml homogenizačního pufru

s fluorogenním substrátem Z-FA-MCA (0,1 mM) tak k témuž roztoku obohacenému o inhibitor katepsinů B a L Z-FF-FMK (0,04 mM). Vzniklé směsi jsme inkubovali 30 minut při 37 °C. Následně jsme zastavili štěpení substrátu přidáním 1 ml 100 mM octanového pufru, pH 4,3. Dále jsme postupovali stejně jako v případě CHTLA proteazomu. Při měření aktivity katepsinů B a L jsme metodicky vycházeli z publikací Koohmaraie a Kretchmar (1990) a Tardy a kol. (2004).

3.11 Modely proteokatabolického stavu (zánětu)

3.11.1 Subkutánní aplikace terpentýnového oleje

Laboratorním potkanům o hmotnosti 35-65 g jsme do podkoží v dorsolumbální oblasti injekčně aplikovali 0,2 ml terpentýnového oleje/100 g tělesné hmotnosti. Kontrolním skupinám jsme stejným způsobem podávali fyziologický roztok. Uvedená dávka terpentýnového oleje způsobuje u laboratorních potkanů nekrózu a lokální zánět v oblasti podání (Wüsteman a kol. 1990). K izolaci kosterních svalů (viz výše, kapitola 3.3) jsme přistoupili po 24 hodinách od aplikace, kdy dosahují proteiny akutní fáze terpentýnem indukovaného zánětu maximálních plazmatických hladin (Zarrabian a kol. 1998, Birch a Schreiber 1986).

3.11.2 Intraperitoneální aplikace lipopolysacharidů E. coli

Laboratorním potkanům o hmotnosti 35-65 g jsme intraperitoneální injekcí podali roztok endotoxinů (E. coli 0127:B8) ve fyziologickém roztoku (2,5 mg/ml) v dávce 0,5 mg/100 g tělesné hmotnosti. Kontrolním skupinám jsme stejným způsobem podávali fyziologický roztok. K izolaci kosterních svalů (viz výše, kapitola 3.3) jsme přistoupili po 24 hodinách od aplikace. Dávka endotoxinů i časový interval působení vycházely z publikace Macallana a kol. (1996) a rovněž z našich předběžných experimentů, kdy jsme za těchto podmínek pozorovali výrazný proteokatabolický efekt (data neuvedena).

3.12 Ostatní metody

Odebraná krev byla centrifugována 15 minut při 2200*g. Biochemická vyšetření z plazmy potkanů (Na⁺, K⁺, glukóza) byla provedena na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové standardními metodami.

Koncentraci proteinů ve vzorcích jsme stanovili podle Lowryho a kol. (1951). Tato metoda je založena na redukci dvojmocných iontů mědi v komplexu s peptidovou vazbou na ionty jednomocné, které reagují s Folin-Ciocalteuovým činidlem za vzniku modrého zbarvení vzorku. Intenzitu zbarvení jsme detekovali spektrofotometricky při vlnové délce 730 nm.

3.13 Statistické zpracování

Statistické zpracování dat jsme provedli pomocí statistického programu NCSS 2001. Podle designu experimentu jsme použili F-test, párový t-test, nepárový t-test, ANOVA a Tukey-Kramer test. Použitý test je vždy uveden u konkrétních výsledků. Ve všech tabulkách a grafech jsou hodnoty uvedeny jako aritmetický průměr a jeho střední chyba (SEM). Statistickou významnost jsme stanovili na $p < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

4.1 Porovnání modelu lokálního zánětu (terpentýnový olej) a sepse (endotoxin) z pohledu vlivu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů potkanů.

Cílem studie bylo porovnat dva laboratorní modely proteokatabolického stavu z hlediska jejich vlivu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých kosterních svalech.

V první části studie byl indukován lokální zánět v dorsolumbální oblasti subkutánní aplikací terpentýnového oleje (0,2 ml/100 g) (T). Kontrolní skupina zvířat stejným způsobem obdržela injekci fyziologického roztoku (K). Po 24 hodinách jsme potkany usmrtili, odebrali vzorky krve a izolovali kosterní svaly (SOL a EDL).

V druhé části jsme u potkanů indukovali sepsi intraperitoneální aplikací endotoxinu (0,5 mg/100 g těl. hmotnosti). Kontrolní skupina stejným způsobem obdržela injekci fyziologického roztoku. Dále jsme postupovali analogicky jako v první části.

Tabulka 5. Ve skupině potkanů ovlivněné terpentýnovým olejem jsme zaznamenali signifikantní snížení hmotnostního přírůstku potkanů v průběhu experimentu o 67 %. Ke statisticky významnému snížení o 23 % došlo také v případě plazmatických hladin draslíku.

Tabulka 5. Vliv terpentýnového oleje na změny tělesné hmotnosti, glykémie, natrémie a kalémie 24 hodin od začátku experimentu.

	K (n=8)	T (n=7)
Nárůst tělesné hmotnosti (%)	9,5±1,1	3,1±1,8*
Krevní plazma		
Glukóza (mmol/l)	9,6±0,3	8,8±0,3
Na ⁺ (mmol/l)	143±1	142±2
K ⁺ (mmol/l)	4,3±0,3	3,3±0,1*

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). F-test a nepárový t-test. *p<0,05 vs. K. K – kontrolní skupina, T – skupina ovlivněná terpentýnovým olejem.

Tabulka 6. U potkanů, jimž jsme podali endotoxin, byl po 24 hodinách zaznamenán pokles hmotnosti oproti počátečnímu stavu. Nesignifikantní trendy k poklesu vlivem endotoxinu jsme zaznamenali i v případě glykémie, hladiny sodíku a draslíku zůstaly nezměněny.

Tabulka 6. Vliv endotoxinu na změny tělesné hmotnosti, glykémie, natrémie a kalémie 24 hodin od začátku experimentu.

	K (n=6)	E (n=6)
Nárůst tělesné hmotnosti (%)	11,1±1,5	-1,9±1,0*
Krevní plazma		
Glukóza (mmol/l)	8,3±0,2	7,7±0,2
Na ⁺ (mmol/l)	136±1	136±1
K ⁺ (mmol/l)	3,8±0,2	4,1±0,2

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). F-test a nepárový t-test. *p<0,05 vs. K. K – kontrolní skupina, E – skupina ovlivněná endotoxinem.

Tabulka 7. Terpentýn indukoval v EDL signifikantní nárůst CHTLA proteazomu a celkové a myofibrilární proteolýzy a zároveň pokles proteosyntézy, zatímco oxidaci leucinu neovlivnil. V SOL významně vzrostla jen celková proteolýza, ostatní měřené parametry zůstaly stabilní. Je patrné, že všechny sledované procesy (s výjimkou proteosyntézy ve svalech intaktních potkanů) probíhaly rychleji v SOL než v EDL a to nezávisle na experimentální skupině.

Tabulka 7. Vliv terpentýnového oleje na základní parametry metabolismu proteinů a aminokyselin ve svalech.

Parametr	EDL _K	SOL _K	EDL _T	SOL _T
CHTLA proteazomu (nmol AMC/g proteinů/hod)	1034±71	2125±125*	1640±106*	2436±174 [♦]
Celková proteolýza (nmol TYR/g svalu/hod)	109±6	171±7*	145±5*	219±16 ^{♦#}
Myofibrilární proteolýza (nmol 3MH/g svalu/hod)	0,542±0,033	1,167±0,086*	0,845±0,119*	1,447±0,157 [♦]
Oxidace leucinu (nmol LEU/g svalu/hod)	45±3	86±7*	59±9	116±12 [♦]
Proteosyntéza (nmol LEU/g proteinů/hod)	2870±136	3269±166	1982±77*	2804±271 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=7 v každé skupině. F-test a párový t-test pro porovnání dat získaných analýzou v rámci jedné experimentální skupiny. Nepárový t-test pro porovnání dat ze stejných typů svalů ale rozdílných experimentálních skupin. *p<0,05 vs. EDL_K, [♦]p<0,05 vs. EDL_T, [#]p<0,05 vs. SOL_K. K – kontrolní skupina, T – skupina ovlivněná terpentýnovým olejem. SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus, AMC-7-amino-4-methylkumarin, TYR-tyrosin, 3MH-3-MethylHistidin, LEU-leucin.

Tabulka 8. Endotoxin v EDL zvýšil celkovou a myofibrilární proteolýzu za současného poklesu hodnot proteosyntézy. V SOL za stejných podmínek došlo ke stimulaci CHTLA proteazomu a myofibrilární proteolýzy. Všechny sledované procesy probíhaly u septických zvířat rychleji v SOL než v EDL. V kontrolní skupině jsme v SOL zaznamenali signifikantně vyšší hodnoty než v EDL v případě celkové a myofibrilární proteolýzy a oxidace leucinu.

Tabulka 8. Vliv endotoxinu na základní parametry metabolismu proteinů a aminokyselin ve svaích.

Parametr	EDL _K	SOL _K	EDL _E	SOL _E
CHTLA proteazomu (nmol AMC/g proteinů/hod)	1654±291	1898±120	2253±174	3077±207 ^{♦#}
Celková proteolýza (nmol TYR/g svalu/hod)	127±8	238±15 [*]	178±7 [*]	279±23 [♦]
Myofibrilární proteolýza (nmol 3MH/g svalu/hod)	0,781±0,039	1,307±0,073 [*]	1,585±0,158 [*]	2,437±0,169 ^{♦#}
Oxidace leucinu (nmol LEU/g svalu/hod)	58±4	98±5 [*]	74±13	122±14 [♦]
Proteosyntéza (nmol LEU/g proteinů/hod)	1573±232	1543±162	828±28 [*]	1404±91 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. F-test a párový t-test pro porovnání dat získaných analýzou v rámci jedné experimentální skupiny. Nepárový t-test pro porovnání dat ze stejných typů svalů ale rozdílných experimentálních skupin. ^{*}p<0,05 vs. EDL_K, [♦]p<0,05 vs. EDL_E, [#]p<0,05 vs. SOL_K. K – kontrolní skupina, E – skupina ovlivněná endotoxinem. SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus, AMC-7-amino-4-methylkumarin, TYR-tyrosin, 3MH-3-MethylHistidin, LEU-leucin.

Tabulka 9. V médiích z EDL terpentýnem ovlivněných potkanů jsme oproti kontrolním médiím zaznamenali statisticky vyšší koncentraci u GLN, v médiích ze SOL u LYS. Pokles nastal u ALA a LEU v médiích ze SOL. Porovnáním hodnot z EDL a SOL v rámci experimentálních skupin jsme v kontrolní skupině SOL zaznamenali signifikantně vyšší hladiny většiny měřených aminokyselin kromě ALA, GLY a LYS než v EDL. Podobně tomu bylo i v terpentýnem ovlivněné skupině, kde výjimku tvořily ALA, ASN a LEU.

Tabulka 9. Vliv terpentýnového oleje na uvolňování aminokyselin ze svalů do médií (nmol/g svalu/hod).

Aminokyselina	EDL _K	SOL _K	EDL _T	SOL _T
ALA	739±117	856±108	595±22	471±25 [#]
ASN	105±19	196±27*	150±11	135±13
GLN	1038±139	1541±218*	1517±72*	2116±176 [♦]
GLU	130±23	330±37*	143±18	370±36 [♦]
GLY	807±197	785±102	712±57	1063±123 [♦]
HIS	143±13	202±21*	170±7	282±29 [♦]
ILE	132±20	208±17*	156±6	266±21 [♦]
LEU	261±32	413±32*	311±11	232±18 ^{♦#}
LYS	360±40	417±30	404±29	584±39 ^{♦#}
MET	73±8	125±10*	83±12	146±8 [♦]
PHE	142±19	222±17*	167±7	264±20 [♦]
PRO	282±21	359±14*	319±14	457±42 [♦]
SER	376±51	570±39*	352±76	740±108 [♦]
VAL	217±30	332±23*	245±11	401±33 [♦]
Odvozené hodnoty				
BCAA	610±82	953±72*	712±28	899±72 [♦]
∑ aminokyselin	4805±729	6556±695*	5324±353	7527±691 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=7 v každé skupině. F-test a párový t-test pro porovnání dat získaných analýzou v rámci jedné experimentální skupiny. Nepárový t-test pro porovnání dat ze stejných typů svalů ale rozdílných experimentálních skupin. *p<0,05 vs. EDL_K, [♦]p<0,05 vs. EDL_T, [#]p<0,05 vs. SOL_K. K – kontrolní skupina, T – skupina ovlivněná terpentýnovým olejem. SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus. BCAA - Branched-Chain Amino Acids (aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - ILE, LEU, VAL).

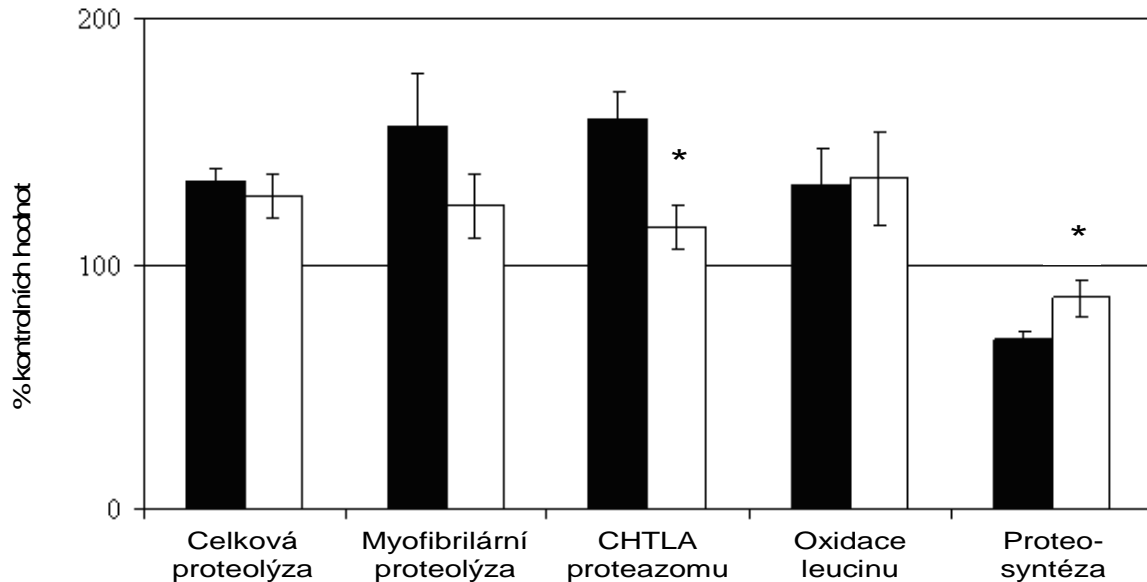
Tabulka 10. V médiích z EDL endotoxinem ovlivněných potkanů jsme oproti kontrolním médiím zaznamenali statisticky vyšší koncentraci u ASN, ILE, LEU, MET A BCAA, v médiích ze SOL u ALA, ASN, ILE, LEU, MET PHE, VAL A BCAA. Porovnáním hodnot z EDL a SOL v rámci experimentálních skupin jsme v kontrolní skupině SOL zaznamenali signifikantně vyšší hladiny všech měřených aminokyselin kromě ALA než v EDL. Podobně tomu bylo i v endotoxinem ovlivněné skupině, kde výjimku tvořil GLY.

Tabulka 10. Vliv endotoxinu na uvolňování aminokyselin ze svalů do médií (nmol/g svalu/hod).

Aminokyselina	EDL _K	SOL _K	EDL _E	SOL _E
ALA	707±45	873±105	1093±107	1254±109 [#]
ASN	111±11	217±18*	209±18*	314±26* [#]
GLN	1093±118	1763±173*	1087±108	2033±135*
GLU	172±12	348±50*	122±12	372±29*
GLY	659±39	966±38*	928±87	1284±121
HIS	126±14	229±22*	149±12	277±19*
ILE	122±7	247±12*	201±11*	322±23* [#]
LEU	244±12	473±24*	379±21*	616±44* [#]
LYS	333±33	553±47*	464±41	704±54*
MET	86±4	153±9*	134±10*	215±15* [#]
PHE	151±6	271±15*	211±16	366±27* [#]
PRO	302±16	492±23*	362±28	592±39*
SER	375±33	690±58*	485±47	797±65*
VAL	224±11	419±20*	327±20	548±36* [#]
Odvozené hodnoty				
BCAA	589±30	1139±55*	907±52*	1486±102* [#]
∑ aminokyselin	4833±293	7934±571*	6328±502	9974±642*

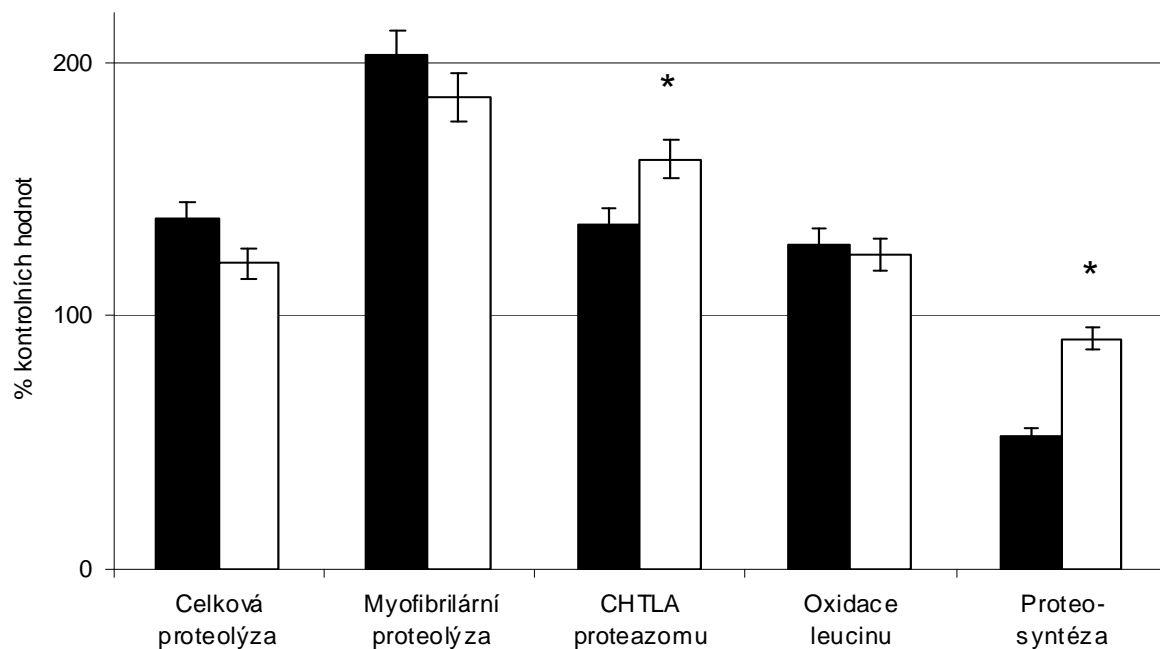
Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. F-test a párový t-test pro porovnání dat získaných analýzou v rámci jedné experimentální skupiny. Nepárový t-test pro porovnání dat ze stejných typů svalů ale rozdílných experimentálních skupin. *p<0,05 vs. EDL_K, [#]p<0,05 vs. EDL_E, [#]p<0,05 vs. SOL_K. K – kontrolní skupina, E – skupina ovlivněná endotoxinem. SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus. BCAA - Branched-Chain Amino Acids (aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - ILE, LEU, VAL).

Graf 1. Relativní vyjádření změn základních parametrů metabolismu proteinů a aminokyselin jasně ukázalo, že na terpentýnový stimul intenzivněji reagoval EDL výraznější stimulací CHTLA proteazomu a inhibicí proteosyntézy.



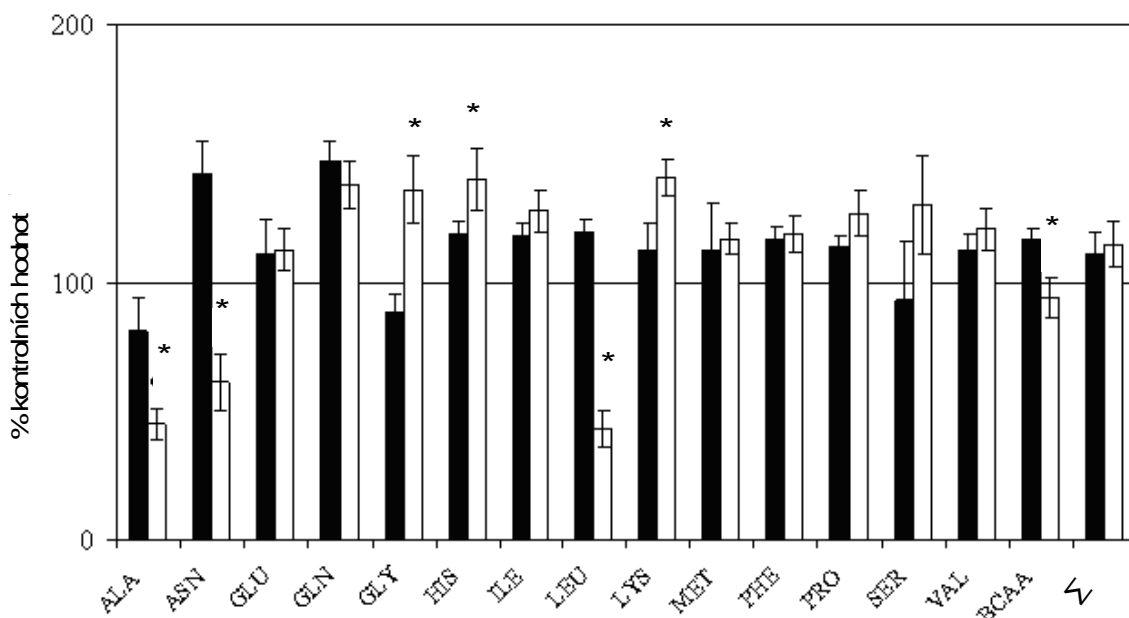
Graf 1. Relativní efekt terpentýnem indukovaného zánětu na základní parametry metabolismu proteinů a aminokyselin v EDL (černé sloupce) a SOL (bílé sloupce). Pro výpočet byla jako 100 % použita průměrná hodnota zjištěná u příslušné kontrolní skupiny. Průměrné hodnoty ± standardní chyba (SEM). n=7 v každé skupině. F-test a nepárový t-test. *p<0,05 vs. EDL.

Graf 2. Z relativního vyjádření změn měřených parametrů vyplynulo, že podání endotoxinu v EDL aktivuje CHTLA proteazomu signifikantně méně a inhibuje proteosyntézu významně více než v SOL.



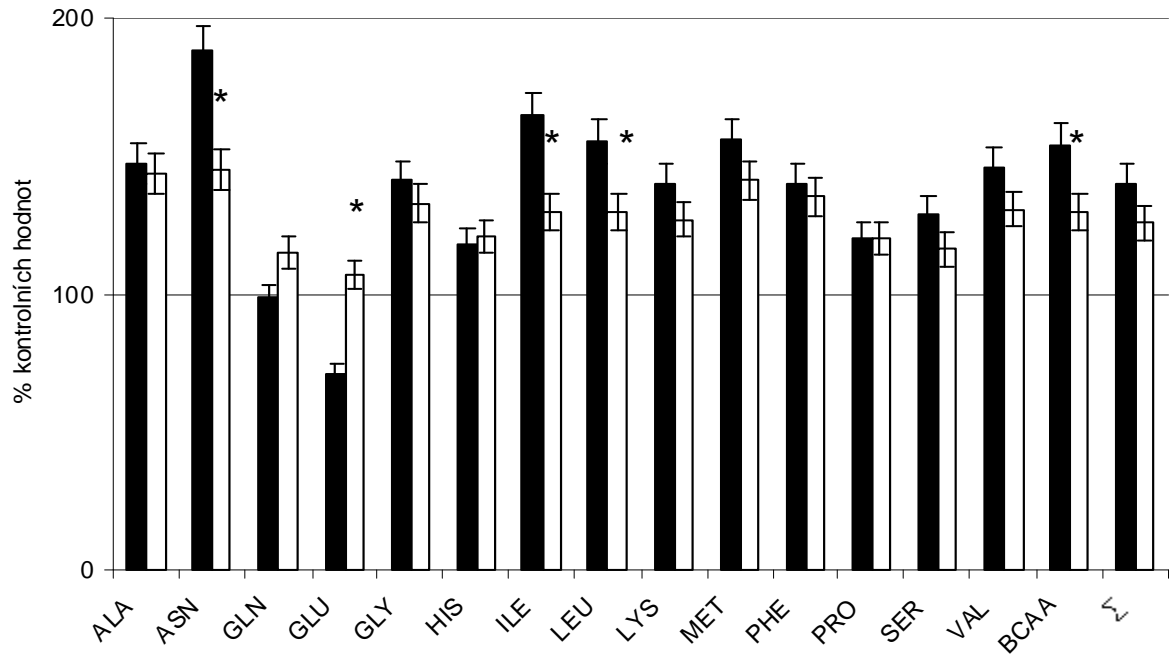
Graf 2. Relativní efekt endotoxinem indukovaného zánětu na základní parametry metabolismu proteinů a aminokyselin v EDL (černé sloupce) a SOL (bílé sloupce). Pro výpočet byla jako 100 % použita průměrná hodnota zjištěná u příslušné kontrolní skupiny. Průměrné hodnoty ± standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. F-test a nepárový t-test. *p<0,05 vs. EDL.

Graf 3. Při relativním vyjádření změn uvolňování aminokyselin do média způsobených terpentýnovým olejem jsme zjistili signifikantní rozdíly mezi SOL a EDL v případě ALA, ASN, GLY, HIS, LEU, LYS a BCAA.



Graf 3. Relativní efekt terpentýnem indukovaného zánětu na uvolňování aminokyselin do média z EDL (černé sloupce) a SOL (bílé sloupce). Pro výpočet byla jako 100 % použita průměrná hodnota zjištěná u příslušné kontrolní skupiny. Průměrné hodnoty ± standardní chyba (SEM). n=7 v každé skupině. F-test a nepárový t-test. *p<0,05 vs. EDL. BCAA - Branched-Chain Amino Acids (aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - ILE, LEU, VAL).

Graf 4. Relativní vyjádření změn koncentrací aminokyselin v médiu ukázalo, že vlivem endotoxinu se ASN, ILE, LEU a BCAA uvolňují z EDL výrazně více, zatímco GLU méně než ze SOL.



Graf 4. Relativní efekt endotoxinem indukovaného zánětu na uvolňování aminokyselin do média z EDL (černé sloupce) a SOL (bílé sloupce). Pro výpočet byla jako 100 % použita průměrná hodnota zjištěná u příslušné kontrolní skupiny. Průměrné hodnoty ± standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. F-test a nepárový t-test. *p<0,05 vs. EDL. BCAA - Branched-Chain Amino Acids (aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - ILE, LEU, VAL).

4.2 Vliv nových inhibitorů proteazomu, belaktosinu A a C, na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních potkanů

Cílem experimentu bylo zhodnotit efekt nových laktonových inhibitorů proteazomu na bázi homobelaktosinu C na metabolismus proteinů a aminokyselin v izolovaných svalech potkanů a porovnat účinky dvou jejich chemicky odlišných forem, belaktosinu A a C.

V této studii jsme použili pouze intaktní potkany. Po izolaci SOL a EDL z obou zadních končetin jsme příslušný sval z pravé končetiny inkubovali vždy v kontrolním médiu, stejný sval z končetiny levé pak v médiu obohaceném o testovaný inhibitor proteazomu v koncentraci 30 $\mu\text{M/l}$. To umožnilo srovnání výsledků z kontrolní a belaktosinové inkubace vždy z jednoho zvířete.

V tabulce 11 prezentujeme výsledky sledování vlivu belaktosinu A na základní parametry metabolismu proteinů a aminokyselin v izolovaných svalech. Tabulka 12 pak zobrazuje hodnoty získané při analogickém experimentu s belaktosinem C. Oba použité inhibitory proteazomu významně snížily CHTLA proteazomu, zatímco aktivity katepsinů B a L zůstaly oproti kontrole nezměněny, a to v obou typech svalů. Rovněž rychlost celkové proteolýzy byla statisticky významně zredukována jak vlivem belaktosinu A tak belaktosinu C nezávisle na typu inkubovaného svalu. Myofibrilární proteolýza klesla pouze vlivem inkubace s belaktosinem A a to u obou typů svalů. Belaktosin C hodnotu tohoto parametru neovlivnil. Oxidace leucinu se výrazně zvýšila působením belaktosinu A i C pouze v SOL. V EDL zůstala nezměněna. Naopak tomu bylo v případě měření rychlosti proteosyntézy, kdy jsme nezávisle na typu použitého inhibitoru zaznamenali významný pokles v EDL, avšak proteosyntéza v SOL nebyla ovlivněna.

Tabulka 11. Vliv belaktosinu A na základní parametry metabolismu proteinů a aminokyselin ve svalech zdravých pokanů.

Parametr	SOL _{A-}	SOL _{A+}	EDL _{A-}	EDL _{A+}
CHTLA proteazomu (nmol AMC/g proteinů/hod) n=8	1150±61	679±44*	1206±119	1022±64 [♦]
Aktivita katepsinů B a L (μmol AMC/g proteinů/hod) n=8	328±35	341±16	278±26	240±21
Celková proteolýza (nmol TYR/g svalu/hod) n=10	273±14	198±8*	140±4	105±3 [♦]
Myofibrilární proteolýza (nmol 3MH/g svalu/hod) n=10	1,260±0,043	1,098±0,049*	0,756±0,024	0,613±0,024 [♦]
Oxidace leucinu (nmol LEU/g svalu/hod) n=8	72±7	88±8*	80±13	89±6
Proteosyntéza (nmol LEU/g proteinů/hod) n=8	1905±92	1757±86	1573±86	1425±63 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). F-test a párový t-test. *p<0,05 vs. SOL_{A-}, [♦]p<0,05 vs. EDL_{A-}. Data z kontrolních inkubací označená „A-“ byla porovnána pouze s daty z inkubací kontralaterálních svalů stejného typu v přítomnosti belaktosinu A („A+“). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus, AMC-7-amino-4-methylkumarin, TYR-tyrosin, 3MH-3-MethylHistidin, LEU-leucin.

Tabulka 12. Vliv belaktosinu C na základní parametry metabolismu proteinů a aminokyselin ve svazech zdravých potkanů.

Parametr	SOL _{C-}	SOL _{C+}	EDL _{C-}	EDL _{C+}
CHTLA proteazomu (nmol AMC/g proteinů/hod) n=8	1236±86	789±62*	1475±94	1015±66 [♦]
Aktivita katepsinů B a L (μmol AMC/g proteinů/hod) n=8	298±26	259±27	285±31	197±21
Celková proteolýza (nmol TYR/g svalu/hod) n=10	258±7	230±8*	135±5	112±6 [♦]
Myofibrilární proteolýza (nmol 3MH/g svalu/hod) n=10	1,122±0,101	1,157±0,096	0,588±0,037	0,528±0,035
Oxidace leucinu (nmol LEU/g svalu/hod) n=8	64±5	79±7*	75±12	91±5
Proteosyntéza (nmol LEU/g proteinů/hod) n=8	1924±90	1769±83	1580±87	1447±66 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). F-test a párový t-test. *p<0,05 vs. SOL_{C-}, [♦]p<0,05 vs. EDL_{C-}. Data z kontrolních inkubací označená „C-“ byla porovnána pouze s daty z inkubací kontralaterálních svalů stejného typu v přítomnosti belaktosinu C („C+“). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus, AMC-7-amino-4-methylkumarin, TYR-tyrosin, 3MH-3-MethylHistidin, LEU-leucin.

Tabulka 13. Analýza média, ve kterém byl inkubován EDL, prokázala, že všechny detekované aminokyseliny s výjimkou GLU se vlivem belaktosinu A uvolňovaly do média pomaleji než při kontrolních inkubacích. V případě SOL již výsledky nebyly tak jednoznačné, neboť signifikantně pomaleji se ze svalů uvolňovaly jen ASN, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO a VAL. V důsledku pak nebyl prokázán signifikantní pokles celkové rychlosti uvolňování aminokyselin do média jako v případě EDL.

Tabulka 13. Vliv belaktosinu A na uvolňování aminokyselin ze svalů zdravých potkanů do médií (nmol/g svalů/hod).

Aminokyselina	SOL _{A-}	SOL _{A+}	EDL _{A-}	EDL _{A+}
ALA	1121±67	1034±42	679±37	594±40 [♦]
ASN	295±26	244±17*	139±6	117±5 [♦]
GLN	2037±124	1944±97	1307±42	1166±19 [♦]
GLU	424±53	385±45	174±21	149±13
GLY	1023±59	876±53	582±30	498±29 [♦]
HIS	333±22	293±13	165±6	141±6 [♦]
ILE	324±14	241±8*	197±10	158±8 [♦]
LEU	590±27	429±15*	289±11	219±10 [♦]
LYS	690±52	560±26*	430±23	375±18 [♦]
MET	168±9	125±6*	84±3	65±4 [♦]
PHE	308±17	227±11*	149±5	120±6 [♦]
PRO	597±34	477±38*	346±13	282±9 [♦]
SER	992±102	868±80	530±29	430±24 [♦]
VAL	473±25	359±14*	227±8	178±8 [♦]
Odvozené hodnoty				
∑ aminokyselin	9588±669	8144±422	5438±187	4597±148 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=10. F-test a párový t-test. *p<0,05 vs. SOL_{A-}, [♦]p<0,05 vs. EDL_{A-}. Data získaná analýzou médií z kontrolních inkubací označená „A-“ byla porovnána pouze s daty z inkubací kontralaterálních svalů stejného typu v přítomnosti belaktosinu A („A+“). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus.

Tabulka 14. Analýza médií z experimentu s belaktosinem C přinesla podobné výsledky jako v případě belaktosinu A. V obou typech svalů byla významně zredukována rychlost uvolňování ILE, LEU, MET, PHE a VAL. V EDL toto platilo navíc pro ALA, ASN, LYS a PRO. Snížené uvolňování všech měřených aminokyselin ze svalu během inkubace s belaktosinem C jsme tak zaznamenali opět pouze v EDL.

Tabulka 14. Vliv belaktosinu C na uvolňování aminokyselin ze svalů zdravých potkanů do médií (nmol/g svalu/hod).

Aminokyselina	SOL _{C-}	SOL _{C+}	EDL _{C-}	EDL _{C+}
ALA	1157±53	1098±56	616±19	451±20 [♦]
ASN	307±11	302±15	118±2	102±5 [♦]
GLN	2013±58	1997±56	1220±41	1106±50
GLU	488±38	568±27	154±17	153±18
GLY	897±29	875±32	489±26	455±30
HIS	313±12	308±11	166±13	140±13
ILE	307±8	261±9 [*]	155±6	117±7 [♦]
LEU	586±17	494±16 [*]	299±12	225±11 [♦]
LYS	817±27	763±43	498±14	457±21 [♦]
MET	169±5	147±6 [*]	79±3	61±3 [♦]
PHE	303±9	267±9 [*]	149±5	123±6 [♦]
PRO	649±19	593±22	356±12	297±11 [♦]
SER	892±63	892±76	404±30	379±34
VAL	463±13	404±14 [*]	234±13	181±10 [♦]
Odvozené hodnoty				
∑ aminokyselin	9619±320	9200±378	5071±158	4358±222 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=10. F-test a párový t-test. *p<0,05 vs. SOL_{C-}, [♦]p<0,05 vs. EDL_{C-}. Data získaná analýzou médií z kontrolních inkubací označená „C-“ byla porovnána pouze s daty z inkubací kontralaterálních svalů stejného typu v přítomnosti belaktosinu C („C+“). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus.

4.3 Vliv bortezomibu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních a septických potkanů

Cílem experimentu bylo zhodnotit vliv dosud jediného IP používaného v klinické praxi, bortezomibu, na metabolismus proteinů a aminokyselin v izolovaném kosterním svalu zdravých a septických potkanů. Sledovali jsme rovněž účinky této látky v závislosti na způsobu expozice.

Ve studii *in vivo* jsme potkany náhodně rozdělili do čtyř experimentálních skupin. Dvěma skupinám jsme indukovali sepsi intraperitoneální aplikací endotoxinu (0,5 mg/100 g těl. hmotnosti). Zbylé dvě (kontrolní) skupiny stejným způsobem obdržely injekci fyziologického roztoku. Bezprostředně poté jsme všem potkanům do podkoží v dorsolumbální oblasti implantovali osmotickou pumpu. Jedné skupině septické (E+B) a jedné kontrolní (K+B) jsme voperovali pumpu s obsahem inhibitoru proteazomu, bortezomibu. Koncentraci inhibitoru a pumpu jsme zvolili tak, aby celková dávka bortezomibu odpovídala 0,2 mg/kg/24 hodin. Zbylým dvěma skupinám (E, K) jsme stejným způsobem voperovali pumpu naplněné fyziologickým roztokem. Po 24 hodinách jsme potkany usmrtili, odebrali vzorky krve a izolovali kosterní svaly (SOL a EDL).

Ve studii *in vitro* jsme analogicky pracovali pouze se dvěma skupinami zvířat – septickými a kontrolními. 24 hodin po začátku experimentu jsme izolovali SOL a EDL z obou zadních končetin a příslušný sval z pravé končetiny inkubovali vždy v kontrolním médiu, stejný sval z končetiny levé pak v médiu obohaceném o bortezomib v koncentraci 250 nM/l. Obsah bortezomibu v médiu tak odpovídal množství této látky uvolněné každou hodinu z osmotické pumpy ve studii *in vivo*.

Tabulka 15. Aplikace endotoxinu stimulovala CHTLA proteazomu v obou typech svalů i studií s výjimkou EDL izolovaného v rámci studie *in vivo*. Bortezomib redukoval toto zvýšení na kontrolní hodnoty nezávisle na způsobu podání (*in vitro*, *in vivo*). Avšak byl-li bortezomib aplikován zdravým jedincům, s výjimkou snížení u EDL při studii *in vitro*, nevykázal inhibiční efekt na CHTLA proteazomu.

Tabulka 15. Vliv bortezomibu na chymotrypsin-like aktivitu proteazomu ve svalech zdravých a septických potkanů (nmol AMC/g proteinů/hod).

	Studie <i>in vivo</i>		Studie <i>in vitro</i>	
	SOL	EDL	SOL	EDL
K	1898±120 [♦]	1654±291	1691±151	1768±74
K+B	1793±117 [♦]	1416±91 [♦]	1660±139	1391±79*
E	3077±207*	2253±174	3044±137*	2560±152*
E+B	1761±62 [♦]	1733±139	1467±114 [♦]	1532±100 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. Studie *in vivo*: ANOVA následovaná testem Tukey-Kramer. Studie *in vitro*: F-test následovaný párovým (K+B vs. K, E+B vs. E) a nepárovým (E vs. K) t-testem. *p<0,05 vs. K, [♦]p<0,05 vs. E. Statisticky porovnávána byla pouze data získaná analýzou supernatantu ze stejného typu svalu. AMC-7-Amino-4-Methylkumarin, SOL – m. SOLeus, EDL – m. Extensor Digitorum Longus, K – kontrolní skupina, K+B – kontrolní skupina ovlivněná bortezomibem, E – skupina ovlivněná endotoxinem, E+B – skupina ovlivněná endotoxinem a bortezomibem.

Tabulka 16. V EDL septických zvířat významně vzrostla celková proteolýza oproti kontrole, zatímco v SOL se nezměnila. Bortezomib, ať už podán septickým potkanům *in vitro* nebo *in vivo*, tento parametr překvapivě dále stimuloval a to i v SOL při podání *in vitro*. V korelaci s CHTLA však bortezomib neovlivnil celkovou proteolýzu u intaktních jedinců.

Tabulka 16. Vliv bortezomibu na celkovou proteolýzu ve svalech zdravých a septických potkanů (nmol TYR/g svalu/hod).

	Studie <i>in vivo</i>		Studie <i>in vitro</i>	
	SOL	EDL	SOL	EDL
K	238±15	127±8 [♦]	256±8	106±3
K+B	250±8	146±9	235±6	100±3*
E	279±23	178±7*	276±13	165±6*
E+B	317±9*	235±16 [♦]	320±16 [♦]	172±6 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. Studie *in vivo*: ANOVA následovaná testem Tukey-Kramer. Studie *in vitro*: F-test následovaný párovým (K+B vs. K, E+B vs. E) a nepárovým (E vs. K) t-testem. *p<0,05 vs. K, [♦]p<0,05 vs. E. Statisticky porovnávána byla pouze data získaná analýzou inkubačního média ze stejného typu svalu. TYR - TYRosin, SOL – m. SOLeus, EDL – m. Extensor Digitorum Longus, K – kontrolní skupina, K+B – kontrolní skupina ovlivněná bortezomibem, E – skupina ovlivněná endotoxinem, E+B – skupina ovlivněná endotoxinem a bortezomibem.

Tabulka 17. Je patrné, že myofibrilární proteolýza byla zvýšená po aplikaci endotoxinu u obou typů svalů i studií. I zde jsme pozorovali nečekaný efekt bortezomibu, kdy jeho podání septickým zvířatům dále myofibrilární proteolýzu stimulovalo, u zdravých potkanů ji však nezměnilo.

Tabulka 17. Vliv bortezomibu na myofibrilární proteolýzu ve svalech zdravých a septických potkanů (nmol 3MH/g svalu/hod).

	Studie <i>in vivo</i>		Studie <i>in vitro</i>	
	SOL	EDL	SOL	EDL
K	1,307±0,073 [♦]	0,781±0,039 [♦]	1,903±0,054	1,034±0,055
K+B	1,700±0,123 [♦]	1,063±0,088 [♦]	1,833±0,051	0,998±0,040
E	2,437±0,169 [*]	1,585±0,158 [*]	2,644±0,175 [*]	2,183±0,156 [*]
E+B	3,388±0,295 ^{**}	2,581±0,185 ^{**}	3,065±0,276 [♦]	2,317±0,185 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. Studie *in vivo*: ANOVA následovaná testem Tukey-Kramer. Studie *in vitro*: F-test následovaný párovým (K+B vs. K, E+B vs. E) a nepárovým (E vs. K) t-testem. *p<0,05 vs. K, [♦]p<0,05 vs. E. Statisticky porovnávána byla pouze data získaná analýzou inkubačního média ze stejného typu svalu. 3MH-3-MethylHistidin, SOL – m. SOLeus, EDL – m. Extensor Digitorum Longus, K – kontrolní skupina, K+B – kontrolní skupina ovlivněná bortezomibem, E – skupina ovlivněná endotoxinem, E+B – skupina ovlivněná endotoxinem a bortezomibem.

Tabulka 18. Zánět indukoval ve svalech oxidaci leucinu. Ale pouze v případě SOL studie *in vitro* došlo k statisticky významné aktivaci tohoto parametru. Ani expozice bortezomibu nepřinesla napříč experimentálními skupinami žádný efekt.

Tabulka 18. Vliv bortezomibu na oxidaci leucinu ve svalech zdravých a septických potkanů (nmol LEU/g svalu/hod).

	Studie <i>in vivo</i>		Studie <i>in vitro</i>	
	SOL	EDL	SOL	EDL
K	98±5	58±4	67±4	52±3
K+B	96±8	85±8	70±3	48±3
E	122±14	74±13	91±10*	65±8
E+B	137±11*	107±11*	102±12	53±4

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. Studie *in vivo*: ANOVA následovaná testem Tukey-Kramer. Studie *in vitro*: F-test následovaný párovým (K+B vs. K, E+B vs. E) a nepárovým (E vs. K) t-testem. *p<0,05 vs. K. Statisticky porovnávána byla pouze data získaná analýzou hyaminu ze stejného typu svalu. LEU – LEUcin, SOL – m. SOLeus, EDL – m. Extensor Digitorum Longus, K – kontrolní skupina, K+B – kontrolní skupina ovlivněná bortezomibem, E – skupina ovlivněná endotoxinem, E+B – skupina ovlivněná endotoxinem a bortezomibem.

Tabulka 19. V EDL septických potkanů (narozdíl od SOL) došlo k inhibici proteosyntézy v obou studiích. Tento pokles byl částečně kompenzován aktivací proteosyntézy vlivem bortezomibu avšak pouze po podání in vitro. Navíc v SOL septických zvířat (*in vitro*) a EDL potkanů intaktních bortezomib působil jako inhibitor proteosyntézy.

Tabulka 19. Vliv bortezomibu na proteosyntézu ve svalech zdravých a septických potkanů (nmol LEU/g proteinů/hod).

	Studie <i>in vivo</i>		Studie <i>in vitro</i>	
	SOL	EDL	SOL	EDL
K	1543±162	1573±232 [♦]	1806±53	1160±52
K+B	1444±79	1083±87 [*]	1767±119	1065±54
E	1404±91	828±28 [*]	1799±204	616±40 [*]
E+B	995±109 [*]	793±107 [*]	1467±77 [♦]	762±32 [♦]

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. Studie *in vivo*: ANOVA následovaná testem Tukey-Kramer. Studie *in vitro*: F-test následovaný párovým (K+B vs. K, E+B vs. E) a nepárovým (E vs. K) t-testem. ^{*}p<0,05 vs. K, [♦]p<0,05 vs. E. Statisticky porovnávana byla pouze data získaná analýzou proteinů ze stejného typu svalu. LEU – LEUcin, SOL – m. SOLeus, EDL – m. Extensor Digitorum Longus, K – kontrolní skupina, K+B – kontrolní skupina ovlivněná bortezomibem, E – skupina ovlivněná endotoxinem, E+B – skupina ovlivněná endotoxinem a bortezomibem.

Tabulka 20. Ačkoliv se ze svalů septických zvířat aminokyseliny uvolňovaly obecně rychleji, signifikantní nárůst jsme v SOL i EDL zachytili pouze v případě BCAA, MET a ASN. Suma uvolněných aminokyselin do média tak vykazovala sice silný leč nesignifikantní trend k nárůstu. Podání borteomibu dále stimulovalo uvolňování aminokyselin ze svalů. V případě SOL zůstalo u trendu, avšak v EDL se s výjimkou GLU, GLN a SER uvolňování aminokyselin ze svalů signifikantně zrychlilo. U zdravých potkanů ale borteomib uvolňování aminokyselin ze svalů nestimuloval. Výjimkou byl nárůst u GLN a HIS v médiu ze SOL.

Tabulka 21. Ve studii *in vitro* byla reakce na endotoxinový stimul obdobná jako při studii *in vivo* s tím rozdílem, že suma uvolněných aminokyselin z EDL byla tentokrát signifikantně vyšší oproti příslušné kontrole. Kultivace SOL septických zvířat s borteomibem přinesla další signifikantní zrychlení uvolňování téměř všech aminokyselin do média. Suma aminokyselin uvolněných z EDL zůstala prakticky stejná v důsledku ambivalentního vlivu borteomibu na uvolňování jednotlivých aminokyselin. Uvolňování většiny aminokyselin ze svalů zdravých zvířat borteomib překvapivě inhiboval, což se projevilo jako signifikantní pokles koncentrací BCAA v médiu z obou typů svalů a statisticky významný pokles sumy aminokyselin v médiu z EDL.

Tabulka 20. Vliv bortezomibu na uvolňování aminokyselin ze svalů zdravých a septických potkanů do médií (nmol/g svalu/hod)-studie *in vivo*.

	K		K+B		E		E+B	
	SOL	EDL	SOL	EDL	SOL	EDL	SOL	EDL
ALA	873±105 [♦]	707±45	1006±34	879±76	1254±109 [*]	1093±107	1252±90	1534±113 ^{♦*}
ASN	217±18 [♦]	111±11 [♦]	257±10	134±12	314±26 [*]	209±18 [*]	361±14 [*]	307±22 ^{♦*}
GLN	1763±173	1093±118	2211±55 [*]	1211±40	2033±135	1087±108	2275±103	1326±67
GLU	348±50	172±12	459±24	169±17	372±29	122±12	436±44	171±10
GLY	966±38	659±39	1135±73	738±71	1284±121	928±87	1629±54 ^{♦*}	1313±67 ^{♦*}
HIS	229±22	126±14	307±11 [*]	159±11	277±19	149±12	310±14 [*]	212±14 ^{♦*}
ILE	247±12 [♦]	122±7 [♦]	277±9	144±9 [♦]	322±23 [*]	201±11 [*]	364±10 [*]	289±25 ^{♦*}
LEU	473±24 [♦]	244±12 [♦]	527±16	288±16 [♦]	616±44 [*]	379±21 [*]	681±16 [*]	523±44 ^{♦*}
LYS	553±47	333±33	642±24	359±14	704±54	464±41	733±33 [*]	684±47 ^{♦*}
MET	153±9 [♦]	86±4 [♦]	181±5	107±7	215±15 [*]	134±10 [*]	241±7 [*]	195±15 ^{♦*}
PHE	271±15 [♦]	151±6	318±9	186±10	366±27 [*]	211±16	403±11 [*]	298±21 ^{♦*}
PRO	492±23	302±16	538±18	309±14	592±39	362±28	630±18 [*]	452±27 ^{♦*}
SER	690±58	375±33	799±39	400±31	797±65	485±47	862±41	621±38 [*]
VAL	419±20 [♦]	224±11	486±14	263±15	548±36 [*]	327±20	610±15 [*]	457±37 ^{♦*}
Odvozené hodnoty								
BCAA	1139±55 [♦]	589±30 [♦]	1291±39	694±40	1486±102 [*]	907±52 [*]	1655±39 [*]	1269±106 ^{♦*}
∑ aminokyselin	7934±571	4833±293	9391±289	5491±297	9974±642	6328±502	11104±405 [*]	8617±458 ^{♦*}

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. ANOVA následovaná testem Tukey-Kramer. *p<0,05 vs. K, [♦]p<0,05 vs. E. Statisticky porovnávána byla pouze data získaná analýzou inkubačního média ze stejného typu svalu. BCAA - Branched-Chain Amino Acids (aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - ILE, LEU, VAL).

Tabulka 21. Vliv bortezomibu na uvolňování aminokyselin ze svalů zdravých a septických potkanů do médií (nmol/g svalu/hod)-studie *in vitro*.

	K		K+B		E		E+B	
	SOL	EDL	SOL	EDL	SOL	EDL	SOL	EDL
ALA	1724±95	798±69	1563±102*	752±58*	1548±45	1389±28*	1867±83♦	1411±41
ASN	296±14	95±7	270±15*	88±7*	293±16	178±7*	358±19♦	183±8
GLN	2682±191	1219±89	2519±199	1142±76*	2083±96*	1238±54	2547±129♦	1117±41♦
GLU	528±35	105±6	449±30*	98±5	330±32*	98±7	435±18♦	68±6♦
GLY	1680±73	1001±42	1687±87	935±30*	1542±54	1169±46*	1801±114♦	1071±28♦
HIS	338±12	125±5	310±11*	122±5	281±14*	149±5*	336±18♦	151±5
ILE	310±8	129±4	287±6*	123±3*	345±15*	214±9*	375±18♦	231±8♦
LEU	598±15	253±7	549±11*	238±4*	645±27	398±16*	698±31♦	426±12♦
LYS	811±26	389±16	731±24	376±12*	766±39	512±18*	906±59♦	520±17
MET	178±5	69±2	163±4*	66±2*	199±10*	128±5*	226±12♦	133±5♦
PHE	316±9	126±3	288±7*	120±2*	335±16	204±8*	381±19♦	214±8♦
PRO	602±18	290±8	560±13	278±7*	557±21	364±8*	630±33♦	380±7♦
SER	955±48	360±20	873±31*	357±39	819±33*	478±16*	1018±64♦	507±19
VAL	489±13	219±5	452±9*	208±4*	536±22*	325±12*	594±28♦	351±9♦
Odvozené hodnoty								
BCAA	1397±36	601±17	1289±26*	569±11*	1528±63*	941±36*	1668±77♦	1012±28♦
∑ aminokyselin	11762±350	5284±155	10938±319	5002±128*	10554±356	7032±203*	12508±563♦	6952±155

Průměrné hodnoty±standardní chyba (SEM). n=8 v každé skupině. F-test následovaný párovým (K+B vs. K, E+B vs. E) a nepárovým (E vs. K) t-testem. *p<0,05 vs. K, ♦p<0,05 vs. E. Statisticky porovnávána byla pouze data získaná analýzou inkubačního média ze stejného typu svalu. BCAA - Branched-Chain Amino Acids (aminokyseliny s rozvětveným řetězcem - ILE, LEU, VAL).

5 DISKUZE

5.1 Porovnání modelu lokálního zánětu (terpentýnový olej) a sepse (endotoxin) z pohledu vlivu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů potkanů

Celková proteolýza vzrostla vlivem terpentýnem indukovaného zánětu v obou sledovaných izolovaných svalech asi o třetinu. Myofibrilární proteolýza za těchto podmínek rovněž rostla, avšak v SOL výrazně méně než v EDL. Podobný rozdíl jsme pozorovali i v případě stimulace CHTLA proteazomu. Aplikace endotoxinu měla vzhledem k terpentýnu srovnatelný dopad na celkovou proteolýzu. Avšak aktivace CHTLA proteazomu byla tentokrát výraznější a to zejména v SOL. Změny v myofibrilární proteolýze se nelišily v závislosti na typu svalu a byly mnohem vyšší než v případě terpentýnového modelu. Tato fakta naznačují spojitost mezi CHTLA proteazomu a myofibrilární proteolýzou, zatímco míra celkové proteolýzy může být ovlivněna aktivitou jiných degradačních systémů (např. lysozomálních). Na druhou stranu je třeba uvést, že myofibrilární vlákna jsou pro degradaci v proteazomu prostorově nepřístupná (Solomon a Goldberg 1996). Aktin a myozin musí být z filament nejprve uvolněny, aby se staly substrátem pro UPS. Děje se tak například činností kaspázy 3 (Du a kol. 2005). Podobné rozdíly ve změnách myofibrilární a celkové proteolýzy v SOL a EDL byly zaznamenány u septických (Hasselgren a kol. 1989, Tiao a kol. 1997) nebo popálených (Fang a kol. 1998, b) potkanů. Preferenční aktivace proteolytických dějů v rychlých svalech (EDL) oproti pomalým (SOL) byla při sepsi dokázána také na molekulární úrovni vyšší expresí mRNA atroginu1/MAFbx, MuRF1 a ubiquitinu (Frost a kol. 2007).

Odlišné reakce SOL a EDL na katabolický podnět mohou být způsobené například jejich rozdílnou senzitivitou vůči katabolickým působkům jako jsou glukokortikoidy nebo cytokiny (Savary a kol. 1998, Fang a kol. 1995), o nichž je zároveň známo, že patří mezi látky silně stimuluující aktivitu UPS (Wang a kol. 1998, Lorite a kol. 2001, Li a kol. 1998, Chai a kol. 2003). Konkrétním příkladem je snížená vaznost glukokortikoidních receptorů vůči ligandům při popáleninách, která je charakteristická pro pomalá svalová vlákna (SOL) (Jacobson a Turinsky 1982). Také rozdíly v aktivaci CHTLA mezi terpentýnovým a endotoxinovým proteokatabolickým

modelem zapadají do tohoto konceptu. Oba modely sice způsobují nárůst plazmatických hladin některých proteinů akutní fáze jako TNF- α , IL-1 β , IL-6 nebo α 2-makroglobulin, ale liší se výrazně v dynamice tohoto procesu. Zatímco u endotoxinového modelu dosahují hladiny prozánětlivých cytokinů maxima obvykle po několika málo až 24 hodinách, u terpentýnového modelu je to obvykle později (až 48 hodin) (Frost a kol. 2007, Rowsey a kol. 2006, Lyoumi a kol. 1998, Wusteman a kol. 1990). Za jednu z příčin je možno považovat rozdílnost související s technickým provedením indukce zánětu, kdy endotoxin byl aplikován do výrazně prokrvenějšího peritonea ve srovnání s podkožím dorsolumbální oblasti (terpentýnový olej). Navíc, soubor cytokinů a jejich množství uvolňované při sepsi či zánětu je závislý na vyvolávacím činiteli. Na sterilní zánět indukovaný terpentýnovým olejem reaguje organismus přednostně kaskádou reakcí začínajících nadprodukcí IL-1 β . Podání endotoxinu jako modelu bakteriální sepse stimuluje produkci více cytokinů, mezi nimiž stěžejní roli hraje TNF- α jako přední proteokatabolický cytokin (Fantuzzi a Dinarello 1996, Tisdale 2008).

Na aktivaci proteolytických dějů u obou testovaných katabolických modelů ukazuje také zvýšené uvolňování aminokyselin ze svalů do inkubačních médií, které však bylo statisticky potvrzeno pouze u endotoxinového modelu. Zde je nutné si uvědomit, že koncentrace aminokyselin v médiích mohou být ovlivněny několika faktory. Patří mezi ně zejména různé transportní mechanismy, katabolismus a syntéza některých aminokyselin a rovněž možnost vazby aminokyselin na buněčné struktury. Interpretace dat získaných analýzou obsahu aminokyselin v kultivačním médiu tedy musí zohledňovat tyto ovlivňující faktory. Nejvýraznější změny jsme detekovali v případě leucinu, jehož koncentrace v médiích ze SOL terpentýnem ovlivněných zvířat poklesla, zatímco v EDL médiích měla rostoucí tendenci. Jelikož jsme nezaznamenali významné změny v oxidaci leucinu, je možné, že se leucin v SOL narozdíl od EDL akumuluje. To naznačuje i studie Hammarqvist a kol. (2001), která dokládá zvýšené intramuskulární koncentrace leucinu jako důsledek podání katabolických hormonů. Výsledky z endotoxinového modelu však tato pozorování nepotvrdily. Přesto výše uvedené rozdíly mezi endotoxinovým a terpentýnovým modelem zánětu jasně ukazují na důležitost vhodné volby proteokatabolického modelu.

Ve svalech ovlivněných zvířat jsme u obou modelů kromě aktivace proteolytických dějů zjistili také inhibici proteosyntézy. Podobné změny ve svalech septických potkanů zaznamenali také Kadlcikova a kol. (2004), na druhou stranu Hasselgren a kol. (1986) nebo Wusteman a kol. (1990) nepozorovali za téměř shodných experimentálních podmínek změny v proteosyntéze. V naší studii však v EDL klesla proteosyntéza statisticky významně, v SOL pouze nesignifikantně. Stejná pozorování učinili Vary a Kimball (1992), když u septických zvířat zdokumentovali pokles proteosyntézy jen v kosterních svalech s převahou tzv. rychlých vláken (v našem případě EDL), nikoli však v tzv. pomalých svalech (SOL). Změny v proteosyntéze do značné míry korespondují (nepřímo úměrně) se změnami v CHTLA proteazomu, což naznačuje souvislost těchto dějů. Jednou z možností je například UPS zprostředkovaná degradace translačních iniciačních faktorů eIF4G nebo eIF3a, jak publikovali Baugh a Pilipenko (2004). Rovněž kumulace leucinu v SOL diskutovaná výše může proteosyntézu ovlivnit. Nedostatek leucinu má totiž za následek redukci proteosyntetických dějů skrze interakci s translačními iniciačními faktory (Vary a kol. 1999) a naopak jeho přebytek proteosyntézu ve svalu stimuluje (Anthony a kol. 2000).

5.2 Vliv nových inhibitorů proteazomu, belaktosinu A a C, na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních potkanů

Přítomnost belaktosinu A i belaktosinu C v inkubačním médiu způsobila inhibici CHTLA proteazomu v SOL i EDL a to ve srovnatelném rozsahu jako většina známých inhibitorů CHTLA proteazomu. Zároveň jsme však nezaznamenali žádný vliv belaktosinů na aktivitu katepsinů B a L, což je častá vlastnost mnohých IP (viz výše, kapitola 1.4.1). Slibnou proteazomální specifitou disponuje také analog belaktosinu A (KF33955), u něhož byla zdokumentována minimální inhibiční aktivita vůči katepsinu B (Asai a kol. 2004). Také celková proteolýza byla výrazně redukována nezávisle na typu svalu a konkrétním belaktosinu. To znovu potvrzuje zásadní roli UPS v degradaci proteinů v kosterním svalu, na kterou poukázali již mnohé práce zabývající se UPS a inhibitory proteazomu jako AdaAhx₃L₃VS (Kadlcikova a kol. 2005), lactacystin (Fang a kol. 1998, a) nebo MG132 (Bailey a kol. 1996, Tawa a kol. 1997). Inhibici celkové proteolýzy částečně potvrdila i kvantitativní analýza aminokyselin uvolněných do inkubačního média. Zatímco v médiích z EDL

ovlivněných belaktosiny byly koncentrace aminokyselin signifikantně nižší, v médiích ze SOL byl pozorován pouze neprůkazný trend k poklesu. Faktory, které mohou ovlivnit konečné množství aminokyselin v médiu již byly diskutovány výše (strana 57), a také v tomto případě je nutné uvažovat jejich působení.

V případě myofibrilární proteolýzy jsme očekávaný pokles v obou izolovaných svalech zachytili pouze po inkubaci s belaktosinem A. Belaktosin C tento parametr neovlivnil. Nabízí se tedy hypotéza, že schopnost IP ovlivnit myofibrilární proteolýzu je funkcí jeho struktury a je nezávislá na inhibičních vlastnostech vůči UPS. Například IP MG132 prokazatelně snižuje myofibrilární proteolýzu (Thompson a kol. 1999), zatímco laktacystin nikoliv (Fang a kol. 1998, a). Zároveň je však obecně známo, že inhibice UPS aktivuje kaspázu 3, což je mimo jiné proteáza kooperující na myofibrilární degradaci (Du a kol. 2005). Tato data jasně ukazují, že přes zásadní roli UPS je myofibrilární degradace komplikovaný multifaktoriální proces, a jeho redukce pomocí IP zdaleka není samozřejmostí.

Zásadní role leucinu jako aktivátoru proteosyntézy (Vary a kol. 1999, Anthony a kol. 2000) v kosterním svalu již byla zmíněna. Zvýšené hodnoty oxidace leucinu jsme zaznamenali jak po inkubaci s belaktosinem A tak i s belaktosinem C, avšak statisticky významný byl tento růst pouze v SOL. Dřívější experimenty provedené v naší laboratoři však při inkubaci s IP AdaAhx₃L₃VS ukázaly zvýšenou oxidaci leucinu v obou typech svalů (Kadlcikova a kol. 2005) a při použití MG132 byl zaznamenán dokonce pokles hodnot tohoto parametru v EDL (Kadlcikova a kol. 2004). Tato fakta tedy spíše než na účinek závislý na typu svalu ukazují na další specifickou vlastnost testovaných belaktosinů. Jelikož klíčovým enzymem v katabolizmu leucinu je dehydrogenáza rozvětvených α -ketokyselin (Lombardo a kol. 1999), jedním z možných vysvětlení je interakce belaktosinů s tímto enzymem. Zde je nutné zmínit, že leucin ovlivňuje nejen proteosyntetické ale také proteolytické děje. Za určitých podmínek leucin sice působí jako inhibitor CHTLA proteazomu (Hamel a kol. 2003), ale jeho α -ketokyselina efektivně snižuje celotělovou proteolýzu (Tischler a kol. 1982). To znamená, že belaktosiny stimulací oxidace leucinu zvyšují svůj antiproteolytický efekt.

Obě testované látky inhibovaly proteosyntézu v EDL nikoliv však v SOL. Uvážíme-li, že belaktosiny signifikantně stimulovaly oxidaci leucinu jen v SOL, lze pokles proteosyntézy v tomto případě těžko spojovat s deplecí leucinu. Ani snížená nabídka

substrátu (aminokyselin) pro proteosyntézu se vzhledem k metodice založené na měření specifické aktivity nejeví jako pravděpodobné vysvětlení. Pokles intramuskulárních koncentrací aminokyselin by totiž vedl k falešně zvýšeným hodnotám proteosyntézy. Naopak se zde nabízí spojitost mezi účinkem a typem svalu podobně jako v případě IP LLnL, který inhibuje proteosyntézu v EDL (Hobler a kol. 1998), zatímco v diafragmě (sval biochemicky podobný SOL) ji nemění (Tawa a kol. 1997).

5.3 Vliv bortezomibu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních a septických potkanů

U septických zvířat jsme zaznamenali obvyklé změny provázející rozvoj proteokatabolického stavu. CHTLA proteazomu v izolovaných kosterních svalech byla indukovaná v souladu s výsledky prací zabývajícími se UPS a sepsí (Chai a kol. 2003, Quereshi a kol. 2003). Celková proteolýza vzrostla a proteosyntéza klesla, signifikantně však pouze v EDL. Podobně oxidace leucinu byla významně aktivována pouze v SOL. Naopak myofibrilární proteolýza byla aktivována v obou typech svalů (detailně viz kapitola 5.1).

Expozice bortezomibu přinesla očekávané snížení CHTLA proteazomu. To se nicméně neprojevilo poklesem celkové ani myofibrilární proteolýzy. Hodnoty těchto parametrů naopak překvapivě vzrostly. Vysvětlení tohoto paradoxu ve své práci nabízí Lightcap a kol. (2000), když dokumentuje aktivační efekt bortezomibu na trypsinu podobnou aktivitu proteazomu (podjednotka $\beta 2$) za současné inhibice CHTLA ($\beta 5$). Vyloučit pak nelze ani interakci s dalšími proteázami jako například katepsiny, které jsou bortezomibem rovněž indukovány (Yeung a kol. 2006). Stimulovaná proteolýza se odrazila také v nárůstu koncentrací aminokyselin uvolněných do média, leč statistický rozdíl jsme prokázali pouze v případě EDL. To mohlo být opět způsobeno faktory diskutovanými výše.

Vzhledem k zásadní roli UPS jako hlavního proteolytického systému, lze uvažovat i o dalších sekundárních efektech bortezomibu, které mohou pomoci vysvětlit získaná data. Inhibice UPS například zvyšuje produkci IL-6 v endoteliálních buňkách (Shibata a kol. 2002) nebo aktivuje tzv. heat shock proteiny (Kawazoe a kol. 1998). V obou

případech se přitom jedná o látky s indukčním vlivem na UPS (Melstrom a kol. 2007, Medicherla a Goldberg 2008).

Proteosyntéza byla bortezomibem ovlivněna nekonzistentně. Ve studii *in vivo* jsme zaznamenali minimální efekt, zatímco expozice bortezomibu *in vitro* inhibovala proteosyntézu v SOL a v EDL ji naopak aktivovala. Vliv bortezomibu na oxidaci leucinu (aminokyselina s přímým vlivem na proteosyntézu) nebyl zaznamenán. Ambivalentní efekt IP na proteosyntézu není neobvyklý (Kadlcikova a kol. 2004, Hobler a kol. 1998) a nejčastěji je vysvětlován jako sekundární efekt ovlivnění UPS, ve kterém probíhá degradace translačních iniciačních faktorů (Baugh a Pilipenko 2004).

Jelikož je bortezomib vysoce biologicky dostupný (Adams a kol. 1999) a aktivní na buněčných kulturách stejně jako zvířecích modelech (Elliott a Ross, 2001), očekávali jsme inhibici CHTLA i u intaktních jedinců. Tento předpoklad se však nenaplnil, podobně jako při srovnávání účinku bortezomibu na zdravé a leukemické lymfocyty (Masdehors a kol. 2000). V tomto smyslu se zdá, že účinek bortezomibu na CHTLA se projevuje v závislosti na faktorech, které jsou společné pro některé patologické stavy. Navíc většina ostatních měřených parametrů zůstala také beze změny, což může sloužit jako další důkaz zásadní role UPS v metabolismu proteinů v kosterním svalstvu.

6 ZÁVĚRY

Porovnání modelu lokálního zánětu (terpentýnový olej) a sepse (endotoxin) z pohledu vlivu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů potkanů.

- Zánět vyvolaný jak podkožní aplikací terpentýnového oleje tak intraperitoneálním podáním endotoxinu lze považovat za funkční model proteokatabolického stavu. Ve svalech aktivoval proteolytické děje a zároveň inhiboval proteosyntézu, což je situace vedoucí k rozvoji negativní proteinové bilance.
- Veškeré námi měřené katabolické i anabolické procesy probíhaly v SOL rychleji než v EDL a to jak za fyziologických podmínek, tak po vyvolání zánětu. Svaly s převahou červených, pomalých vláken (SOL) jsou tedy metabolicky aktivnější než svaly složené z větší části z vláken bílých, rychlých (EDL).
- Na proteokatabolický stimul reagují výrazněji rychlé svaly (EDL) než pomalé (SOL). Metabolické změny ve svalech vyvolané zánětem indukovaným aplikací terpentýnového oleje byly intenzivnější v EDL než v SOL, což dokumentují zejména výraznější aktivace CHTLA a inhibice proteosyntézy. Obdobně tomu bylo u endotoxinového modelu s výjimkou CHTLA proteazomu, která byla v tomto případě více stimulována v SOL.

Vliv nových inhibitorů proteazomu, belaktosinu A a C, na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních potkanů.

- Chemicky modifikované belaktosiny A a C inhibovaly CHTLA proteazomu a celkovou proteolýzu v izolovaných svalech. Aktivitu katepsinů B a L nezměnily. Tyto výsledky dokazují, že belaktosiny jsou účinné *in vitro* inhibitory proteazomu a demonstrují zásadní úlohu UPS při degradaci proteinů v kosterním svalu.
- Myofibrilární proteolýza byla signifikantně inhibována pouze belaktosinem A. Tento proces tedy evidentně není závislý výhradně na UPS (inhibovaný také belaktosinem C), ale podléhá i jiným mechanismům. Rozdíl v účinku je v tomto případě evidentní funkcí chemické struktury testovaných belaktosinů.

- Obě testované látky aktivovaly oxidaci leucinu jen v SOL a inhibovaly proteosyntézu pouze v EDL. Tyto účinky belaktosinů jsou tedy tkáňově specifické.

Vliv bortezomibu na metabolismus proteinů a aminokyselin v různých typech kosterních svalů intaktních a septických potkanů.

- Bortezomib inhiboval zvýšenou CHTLA proteazomu ve svalech septických potkanů jak při podání *in vivo* tak *in vitro*, což dokazuje jeho přímou interakci s UPS.
- Celková a myofibrilární proteolýza se ve svalech septických zvířat po podání bortezomibu zvýšila, což ukazuje na stimulační účinek bortezomibu na jiné proteolytické mechanismy.
- Účinek bortezomibu na proteosyntézu ve svalech septických potkanů byl ambivalentní a lišil se v závislosti na typu svalu a způsobu podání. Vezmeme-li v úvahu jeho aktivační efekt na proteolýzu, je zřejmé, že v našich podmínkách bortezomib nemohl redukovat ztráty svalových bílkovin způsobené septickým stavem.
- Ve svalech zdravých zvířat bortezomib vykázal minimální účinky. Jeho efekt na metabolismus bílkovin v kosterním svalu tedy přímo souvisel s mechanismy aktivovanými při sepsi.

7 LITERATURA

1. Adams J, Behnke M, Chen S, Cruickshank AA, Dick LR, Grenier L, Klunder JM, Ma YT, Plamondon L, Stein RL: Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg Med Chem Lett* **1998**;8(4):333-8
2. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ: Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* **1999**;59:2615–2622
3. Alroy I, Tuvia S, Greener T, Gordon D, Barr HM, Taglicht D, Mandil-Levin R, Ben-Avraham D, Konforty D, Nir A, Levius O, Bicoviski V, Dori M, Cohen S, Yaar L, Erez O, Propheta-Meirani O, Koskas M, Caspi-Bachar E, Alchanati I, Sela-Brown A, Moskowitz H, Tessmer U, Schubert U, Reiss Y: The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102(5):1478-83
4. Anbanandam A, Albarado DC, Tirziu DC, Simons M, Veeraraghavan S: Molecular basis for proline- and arginine-rich peptide inhibition of proteasome. *J Mol Biol* **2008**;384(1):219-27
5. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR: Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* **2000**;130(10):2413-9
6. Asai A, Tsujita T, Sharma SV, Yamashita Y, Akinaga S, Funakoshi M, Kobayashi H, Mizukami T: A new structural class of proteasome inhibitors identified by microbial screening using yeast-based assay. *Biochem Pharmacol* **2004**;67(2): 227-34
7. Attaix D, Taillandier D, Temparis S, Larbaud D, Aurousseau E, Combaret L, Voisin L: Regulation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in muscle wasting. *Reprod Nutr Dev* **1994**;34(6):583-97
8. Bailey JL, Wang X, England BK, Price SR, Ding X, Mitch WE: The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest* **1996**;97(6):1447-53
9. Baugh JM, Pilipenko EV: 20S proteasome differentially alters translation of different mRNAs via the cleavage of eIF4F and eIF3. *Mol Cell* **2004**;16:575-586

10. Bazel S, Andrejko KM, Chen J, Deutschman CS: Hepatic gene expression and cytokine responses to sterile inflammation: comparison with cecal ligation and puncture sepsis in the rat. *Shock* **1999**;11(5):347-55
11. Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D: Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* **2005**;37(10):2098-114
12. Berthelot A, Piguel S, Le Dour G, Vidal J: Synthesis of macrocyclic peptide analogues of proteasome inhibitor TMC-95A. *J Org Chem* **2003**;68(25):9835-8
13. Birch HE, Schreiber G: Transcriptional regulation of plasma protein synthesis during inflammation. *J Biol Chem* **1986**;261,8077–8080
14. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ: Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **2001**;294(5547):1704-8.
15. Borissenko L, Groll M: 20S proteasome and its inhibitors: crystallographic knowledge for drug development. *Chem Rev* **2007**;107(3):687-717
16. Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Grieco G, Bonelli G, Pacelli F, Rossi Fanelli F, Doglietto GB, Baccino FM: Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Ann Surg* **2003**;237(3):384-9
17. Bottinelli R, Reggiani C: Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* **2000**;73(2-4):195-262
18. Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M: The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* **1999**;1(4):221-6
19. Braun HA, Umbreen S, Groll M, Kuckelkorn U, Mlynarczuk I, Wigand ME, Drung I, Kloetzel PM, Schmidt B: Tripeptide mimetics inhibit the 20 S proteasome by covalent bonding to the active threonines. *J Biol Chem* **2005**;280(31):28394-401
20. Brink M, Anwar A, Delafontaine P: Neurohormonal factors in the development of catabolic/anabolic imbalance and cachexia. *Int J Cardiol* **2002**;85(1):111-21, discussion 121-4
21. Cai D, Frantz JD, Tawa NE Jr, Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE: IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **2004**;119(2):285-98

22. Ciechanover A, Iwai K: The ubiquitin system: from basic mechanisms to the patient bed. *IUBMB Life* **2004**;56(4):193-201
23. Cohen SA, Michaud DP: Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **1993**;211(2):279-87
24. Corey EJ, Li WD: Total synthesis and biological activity of lactacystin, omuralide and analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1999**;47(1):1-10
25. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, Buchholz TJ, Dajee M, Ho MN, Jiang J, Laidig GJ, Lewis ER, Parlati F, Shenk KD, Smyth MS, Sun CM, Vallone MK, Woo TM, Molineaux CJ, Bennett MK: Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res* **2007**;67(13):6383-91
26. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ: Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **2000**;103(2):351-61
27. Dou QP, Landis-Piowar KR, Chen D, Huo C, Wan SB, Chan TH: Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology* **2008**;16(5):208-12
28. Du J, Hu Z, Mitch WE: Molecular mechanisms activating muscle protein degradation in chronic kidney disease and other catabolic conditions. *Eur J Clin Invest* **2005**;35(3):157-63
29. Elliott PJ, Ross JS: The proteasome: a new target for novel drug therapies. *Am J Clin Pathol* **2001**;116(5):637-46
30. Fang CH, James HJ, Ogle C, Fischer JE, Hasselgren PO: Influence of burn injury on protein metabolism in different types of skeletal muscle and the role of glucocorticoids. *J Am Coll Surg* **1995**;180(1):33-42
31. Fang CH, Li BG, James JH, King JK, Evenson AR, Warden GD, Hasselgren PO: Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor and glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Endocrinology* **2005**;146(7):3141-9
32. Fang CH, Li BG, Tiao G, Wang JJ, Fischer JE, Hasselgren PO: The molecular regulation of protein breakdown following burn injury is different in fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Int J Mol Med* **1998**;1(1):163-9, b

33. Fang CH, Wang JJ, Hobler S, Li BG, Fischer JE, Hasselgren PO: Proteasome blockers inhibit protein breakdown in skeletal muscle after burn injury in rats. *Clin Sci (Lond)* **1998**;95(2):225-233, a
34. Fantuzzi G, Dinarello CA: The inflammatory response in interleukin-1 beta-deficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol* **1996**;59(4):489-93
35. Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W: Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospora. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**;42(3):355-7
36. Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS, Lang CH: Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2007**;292(2):E501-12
37. Gaczynska M, Osmulski PA, Gao Y, Post MJ, Simons M: Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity. *Biochemistry* **2003**;42(29):8663-70
38. Gallagher SJ, Kefford RF, Rizos H: The ARF tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**;38(10):1637-41
39. Gao M, Labuda T, Xia Y, Gallagher E, Fang D, Liu YC, Karin M: Jun turnover is controlled through JNK-dependent phosphorylation of the E3 ligase Itch. *Science* **2004**;306(5694):271-5
40. Gao Y, Lecker S, Post MJ, Hietaranta AJ, Li J, Volk R, Li M, Sato K, Saluja AK, Steer ML, Goldberg AL, Simons M: Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest* **2000**;106(3):439-48
41. Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert CW 4th, Piehl K, Saltin B: Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J Appl Physiol* **1972**;33(3):312-9
42. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL: Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**;98(25):14440-5
43. Gomes-Marcondes MCC, Tisdale MJ: Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett* **2002**;180(1):69-74

44. Groll M, Berkers CR, Ploegh HL, Ovaas H: Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure* **2006**;14(3):451-6
45. Groll M, Götz M, Kaiser M, Weyher E, Moroder L: TMC-95-based inhibitor design provides evidence for the catalytic versatility of the proteasome. *Chem Biol* **2006**;13(6):607-14
46. Groll M, Heinemeyer W, Jäger S, Ullrich T, Bochtler M, Wolf DH, Huber R: The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**;96(20):10976-83
47. Groll M, Schellenberg B, Bachmann AS, Archer CR, Huber R, Powell TK, Lindow S, Kaiser M, Dudler R: A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature* **2008**;452(7188):755-8
48. Guédat P, Colland F: Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system. *BMC Biochem* **2007**; 8 Suppl 1:S14
49. Gupta RC, Misulis KE, Dettbarn WD: Activity dependent characteristics of fast and slow muscle: biochemical and histochemical considerations. *Neurochem Res* **1989**;14(7):647-55
50. Hamel FG, Upward JL, Siford GL, Duckworth WC: Inhibition of proteasome activity by selected amino acids. *Metabolism* **2003**;52(7):810-4
51. Hammarqvist F, Ejesson B, Wernerman J: Stress hormones initiate prolonged changes in the muscle amino acid pattern. *Clin Physiol* **2001**;21(1):44-50
52. Hasselgren PO, James JH, Benson DW, Hall-Angeras M, Angeras U, Hiyama DT, Li S, Fischer JE: Total and myofibrillar protein breakdown in different types of rat skeletal muscle: effects of sepsis and regulation by insulin. *Metabolism* **1989**;38(7):634-40
53. Hasselgren PO, Talamini M, James JH, Fischer JE: Protein metabolism in different types of skeletal muscle during early and late sepsis in rats. *Arch Surg* **1986**;121(8):918-23
54. Hicke L: Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**;2(3):195-201
55. Hines J, Groll M, Fahnstock M, Crews CM: Proteasome inhibition by fellutamide B induces nerve growth factor synthesis. *Chem Biol* **2008**;15(5):501-12

56. Hobler SC, Tiao G, Fischer JE, Monaco J, Hasselgren PO: Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors. *Am J Physiol* **1998**;274(1 Pt 2):R30-7
57. Hoffman L, Rechsteiner M: Activation of the multicatalytic protease. The 11 S regulator and 20 S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. *J Biol Chem* **1994**;269(24):16890-5
58. Hosler MR, Wang-Su ST, Wagner BJ: Role of the proteasome in TGF-beta signaling in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2006**;47(5):2045-52
59. Huang L, Ho P, Chen CH: Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS Lett* **2007**;581(25):4955-9
60. Chai J, Wu Y, Sheng ZZ: Role of ubiquitin - proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia. *Crit Care Med* **2003**;31(6):1802-1807
61. Chai J., Wu Y., Sheng Z. Z: The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin - proteasome proteolytic pathway in burned rats. *Burns* **2002**;28(6): 527 – 533
62. Chenevier-Gobeaux C, Lemarechal H, Bonnefont-Rousselot D, Poiraudreau S, Ekindjian OG, Borderie D: Superoxide production and NADPH oxidase expression in human rheumatoid synovial cells: regulation by interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha. *Inflamm Res* **2006**;55(11):483-90
63. Iijima M, Momose I, Ikeda D: TP-110, a new proteasome inhibitor, down-regulates IAPs in human multiple myeloma cells. *Anticancer Res* **2009**;29(4):977-85
64. Iqbal M, Chatterjee S, Kauer JC, Das M, Messina P, Freed B, Biazzo W, Siman R: Potent inhibitors of proteasome. *J Med Chem* **1995**;38(13):2276-7
65. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr: HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **2001**;292(5516):464-8
66. Izzì L, Attisano L: Ubiquitin-dependent regulation of TGFbeta signaling in cancer. *Neoplasia* **2006**;8(8):677-88
67. Jacobson HI, Turinsky J: Effect of thermal injury on glucocorticoid and androgen binding in skeletal muscles with different fiber populations. *J Trauma* **1982**;22(10):845-52

68. Joazeiro CA, Weissman AM: RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* **2000**;102(5):549-52
69. Kadlcikova J, Holecek M, Safranek R, Tilser I, Kessler BM: Effects of proteasome inhibitors MG132, ZL3VS and AdaAhx3L3VS on protein metabolism in septic rats. *Int J Exp Pathol* **2004**;85(6):365-71
70. Kadlcikova J, Holecek M, Safranek R, Tilser I: Direct effects of proteasome inhibitor AdaAhx3L3VS on protein and amino acid metabolism in rat skeletal muscle. *Physiol Res* **2005**;54(5):541-7
71. Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I, Ezaki O: Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem* **2004**;279(39):41114-23
72. Kandarian SC, Jackman RW: Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve* **2006**;33(2):155-65
73. Kawazoe Y, Nakai A, Tanabe M, Nagata K: Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock factor family. *Eur J Biochem* **1998**;255:356-362
74. Kernell D, Hensbergen E, Lind A, Eerbeek O: Relation between fibre composition and daily duration of spontaneous activity in ankle muscles of the cat. *Arch Ital Biol* **1998**;136(3):191-203
75. Kessler BM, Tortorella D, Altun M, Kisselev AF, Fiebigler E, Hekking BG, Ploegh HL, Overkleeft HS: Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits. *Chem Biol* **2001**;8(9):913-29
76. Kisselev AF, Callard A, Goldberg AL: Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* **2006**;281(13):8582-90
77. Kisselev AF, Goldberg AL: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* **2001**;8:739-58
78. Kloetzel PM: Antigen processing by the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2001**;2:179-188
79. Koguchi Y, Kohno J, Nishio M, Takahashi K, Okuda T, Ohnuki T, Komatsubara S: TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced

- by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation, and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **2000**;53(2):105-9
80. Koochmaraie M, Kretchmar DH: Comparisons of four methods for quantification of lysosomal cysteine proteinase activities. *J Anim Sci* **1990**;68:2362-70
81. Kroll M, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, Thomas D, Friguet B, Conconi M: The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem Biol* **1999**;6(10):689-98
82. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, Demo SD, Bennett MK, van Leeuwen FW, Chanan-Khan AA, Orłowski RZ: Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood* **2007**;110(9):3281-90
83. Landis-Piwowar KR, Wan SB, Wiegand RA, Kuhn DJ, Chan TH, Dou QP: Methylation suppresses the proteasome-inhibitory function of green tea polyphenols. *J Cell Physiol* **2007**;213(1):252-60
84. Li Y-P, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB: Skeletal muscle myotubes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- κ B activation in response to tumour necrosis factor α . *FASEB J* **1998**;12:871-880
85. Lightcap ES, McCormack TA, Pien CS, Chau V, Adams J, Elliott J: Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin Chem* **2000**;46(5):673-83
86. Link W, Oyarzabal J, Serelde BG, Albarran MI, Rabal O, Cebria A, Alfonso P, Fominaya J, Renner O, Peregrino S, Soilan D, Ceballos PA, Hernandez AI, Lorenzo M, Pevarello P, Granda TG, Kurz G, Carnero A, Bischoff JR: Chemical interrogation of FOXO3a nuclear translocation identifies potent and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem* **2009**;Epub ahead of print
87. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: Molecular cell biology. New York: W. H. Freeman and company, **2001**
88. Loidl G, Groll M, Musiol HJ, Ditzel L, Huber R, Moroder L: Bifunctional inhibitors of the trypsin-like activity of eukaryotic proteasomes. *Chem Biol* **1999**;6(4):197-204

89. Lombardo YB, Serdikoff C, Thamotharan M, Paul HS, Adibi SA: Inverse alterations of BCKA dehydrogenase activity in cardiac and skeletal muscles of diabetic rats. *Am J Physiol* **1999**;277(4 Pt 1):E685-92
90. Long CL, Haverberg LN, Young VR, Kinney JM, Munro HN, Geiger JW: Metabolism of 3-methylhistidine in man. *Metabolism* **1975**;24(8):929-35
91. Lorite MJ, Smith HJ, Arnold JA, Morris A, Thompson MG, Tisdale MJ: Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). *Br J Cancer* **2001**;85:297-302
92. Lövborg H, Oberg F, Rickardson L, Gullbo J, Nygren P, Larsson R: Inhibition of proteasome activity, nuclear factor-KappaB translocation and cell survival by the antialcoholism drug disulfiram. *Int J Cancer* **2006**;118(6):1577-80
93. Lowell BB, Ruderman NB, Goodman MN: Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism* **1986**;35(12):1121-7
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**;193:265-75
95. Lyoumi S, Tamion F, Petit J, Déchelotte P, Dauguet C, Scotté M, Hiron M, Leplingard A, Salier JP, Daveau M, Lebreton JP: Induction and modulation of acute-phase response by protein malnutrition in rats: comparative effect of systemic and localized inflammation on interleukin-6 and acute-phase protein synthesis. *J Nutr* **1998**;128(2):166-74
96. Macallan DC, Cook EB, Preedy VR, Griffin GE: The effect of endotoxin on skeletal muscle protein gene expression in the rat. *Int J Biochem Cell Biol* **1996**;28(5):511-20
97. Macallan DC, Cook EB, Preedy VR, Griffin GE: The effect of endotoxin on skeletal muscle protein gene expression in the rat. *Int J Biochem Cell Biol* **1996**;28(5):511-20
98. Maizels EZ, Ruderman NB, Goodman MN, Lau D: Effect of acetoacetate on glucose metabolism in the soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat. *Biochem J* **1977**;162:557-68
99. Masdehors P, Merle-Beral H, Maloum K, Omura S, Magdelenat H, Delic J: Deregulation of the ubiquitin system and p53 proteolysis modify the apoptotic response in B-CLL lymphocytes. *Blood* **2000**;96(1):269-274

100. Mayer RJ: The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**;1(2):145-8
101. Medicherla B, Goldberg AL: Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *J Cell Biol* **2008**;182(4):663-73
102. Melstrom LG, Melstrom KA Jr, Ding XZ, Adrian TE: Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia. *Histol Histopathol* **2007**;22(7):805-14
103. Momose I, Umezawa Y, Hirosawa S, Iinuma H, Ikeda D: Structure-based design of derivatives of tyropeptin A as the potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**;15(7):1867-71
104. Muthny T, Kovarik M, Sispera L, Tilser I, Holecek M: Protein metabolism in slow- and fast-twitch skeletal muscle during turpentine-induced inflammation. *Int J Exp Path* **2008**;89:64-71
105. Nazif T, Bogoyo M: Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**;98(6):2967-72
106. Nিকেleit I, Zender S, Sasse F, Geffers R, Brandes G, Sørensen I, Steinmetz H, Kubicka S, Carlomagno T, Menche D, Gütgemann I, Buer J, Gossler A, Manns MP, Kalesse M, Frank R, Malek NP: Argyrin a reveals a critical role for the tumor suppressor protein p27(kip1) in mediating antitumor activities in response to proteasome inhibition. *Cancer Cell* **2008**;14(1):23-35
107. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R: A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **2005**;123(5):773-86
108. Nury D, Doucet C, Coux O: Roles and potential therapeutic targets of the ubiquitin proteasome system in muscle wasting. *BMC Biochem* **2007**;8 Suppl 1:S7
109. Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B: The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* **1971**;246:174-81
110. Omura S, Fujimoto T, Otoguro K, Matsuzaki K, Moriguchi R, Tanaka H, Sasaki Y: Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. *J Antibiot (Tokyo)* **1991**;44(1):113-6

111. Orłowski M, Cardozo C, Michaud C: Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* **1993**;32(6):1563-72
112. Ostrowska H, Wójcik C, Wilk S, Omura S, Kozłowski L, Stokłosa T, Worowski K, Radziwon P: Separation of cathepsin A-like enzyme and the proteasome: evidence that lactacystin/beta-lactone is not a specific inhibitor of the proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* **2000**;32(7):747-57
113. Pajonk F, Scholber J, Fiebich B: Hypericin-an inhibitor of proteasome function. *Cancer Chemother Pharmacol* **2005**;55(5):439-46
114. Pette D, Staron RS: Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* **2000**;50(6):500-9
115. Pickart CM, Cohen RE: Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**;5(3):177-87
116. Qureshi N, Perera PY, Shen J, Zhang G, Lenschat A, Splitter G, Morrison DC, Vogel SN: The proteasome as a lipopolysaccharide-binding protein in macrophages: differential effects of proteasome inhibition on lipopolysaccharide-induced signaling events. *J Immunol* **2003**;171(3):1515-25
117. Reverter M, Lundh T, Lindberg JA: Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **1997**;696(1):1-8
118. Rivero JL, Talmadge RJ, Edgerton VR: Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training. *Anat Rec* **1996**;246(2):195-207
119. Rivero JL, Talmadge RJ, Edgerton VR: Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **1998**;19(7):733-42
120. Rock KL, Goldberg AL: Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* **1999**;17:739-79
121. Rowsey PJ, Metzger BL, Carlson J, Gordon CJ: Effects of chronic exercise conditioning on thermal responses to lipopolysaccharide and turpentine abscess in female rats. *Arch Toxicol* **2006**;80(2):81-7

122. Safranek R, Holecek M, Kadlcikova J, Chladek J, Mislanova C, Kukan M: Method of measurement of protein metabolism in isolated skeletal muscle of the rat. *Acta Medica Suppl* **2003**;46: 33-7,b
123. Safranek R, Holecek M, Kadlcikova J, Sprongl L, Mislanova C, Kukan M, Chladek J: Effect of acute acidosis on protein and amino acid metabolism in rats. *Clin Nutr* **2003**;22(5):437-43, a
124. Sant'ana Pereira JA, Wessels A, Nijtmans L, Moorman AF, Sargeant AJ: New method for the accurate characterization of single human skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC expression in pure and hybrid fibre types. *J Muscle Res Cell Motil* **1995**;16(1):21-34
125. Savary I, Debras E, Dardevet D, Sornet C, Capitan P, Prugnaud J, Mirand PP, Grizard J. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. *Br J Nutr* **1998**;79(3):297-304
126. Semple CA, RIKEN GER Group, GSL Members: The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome Res* **2003**;13(6B):1389-94
127. Shaw E: CysteinyI proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1990**;63:271-347
128. Shibata T, Imaizumi T, Tamo W, Matsumiya T, Kumagai M, Cui XF, Yoshida H, Takaya S, Fukuda I, Satoh K: Proteasome inhibitor MG-132 enhances the expression of interleukin-6 in human umbilical vein endothelial cells: involvement of MAP/ERK kinase. *Immunol Cell Biol* **2002**;80:226-230
129. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM: Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **1995**;373(6509):81-3
130. Schiaffino S, Reggiani C: Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* **1996**;76(2):371-423
131. Simoneau JA, Bouchard C: Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *FASEB J* **1995**;9(11):1091-5
132. Singleton JR, Baker BL, Thorburn A: Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis. *Endocrinology* **2000**;141:2945–2950
133. Solomon V, Goldberg AL: Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* **1996**;271(43):26690-7

134. Soukup T, Zacharová G, Smerdu V: Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem* **2002**;104(4):399-405
135. Sulciner DJ, Irani K, Yu ZX, Ferrans VJ, Goldschmidt-Clermont P, Finkel T: rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* **1996**;16:7115–7121
136. Suzuki N, Suzuki T, Uchida A, Thompson EA, Hosoya T: Effect of dexametazone on nucleolar casein kinase II activity and phosphorylation of nucleolin in lymphosarcome P1798 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1992**;42:305-312
137. Tardy C, Autefage H, Garcia V, Levade T, Andrieu-Abadie N: Mannose 6-phosphorylated proteins are required for tumor necrosis factor-induced apoptosis: defective response in I-cell disease fibroblasts. *J Biol Chem* **2004**;279(51):52914-23
138. Tawa NE Jr, Odessey R, Goldberg AL: Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest* **1997**;100(1):197-203
139. Thompson MG, Thom A, Partridge K, Garden K, Campbell GP, Calder G, Palmer RM: Stimulation of myofibrillar protein degradation and expression of mRNA encoding the ubiquitin-proteasome system in C(2)C(12) myotubes by dexamethasone: effect of the proteasome inhibitor MG-132. *J Cell Physiol* **1999**;181(3):455-61
140. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM: Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **2000**;19(1):94-102
141. Tiao G, Lieberman M, Fischer JE, Hasselgren PO: Intracellular regulation of protein degradation during sepsis is different in fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol* **1997**;272(3 Pt 2):R849-56
142. Tisdale MJ: Catabolic mediators of cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* **2008**;2(4):256-61
143. Tisdale MJ: Is there a common mechanism linking muscle wasting in various disease types? *Curr Opin Support Palliat Care* **2007**;1(4):287-92
144. Tischler ME, Desautels M, Goldberg AL: Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle? *J Biol Chem* **1982**;257(4):1613-21

145. van Swieten PF, Samuel E, Hernández RO, van den Nieuwendijk AM, Leeuwenburgh MA, van der Marel GA, Kessler BM, Overkleeft HS, Kisselev AF: A cell-permeable inhibitor and activity-based probe for the caspase-like activity of the proteasome. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**;17(12):3402-5
146. Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR: Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **1999**;277(6 Pt 1):E1077-86
147. Vary TC, Kimball SR: Sepsis-induced changes in protein synthesis: differential effects on fast- and slow-twitch muscles. *Am J Physiol* **1992**;262(6 Pt 1):C1513-9
148. Vijay-Kumar S, Bugg CE, Wilkinson KD, Vierstra RD, Hatfield PM, Cook WJ: Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. *J Biol Chem* **1987**;262(13):6396-9
149. Vispé S, Vandenberghe I, Robin M, Annereau JP, Créancier L, Pique V, Galy JP, Kruczynski A, Barret JM, Bailly C: Novel tetra-acridine derivatives as dual inhibitors of topoisomerase II and the human proteasome. *Biochem Pharmacol* **2007**;73(12):1863-72
150. Voges D, Zwickl P, Baumeister W: The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **1999**;68:1015-68
151. Voisin L, Breuille D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Aurousseau E, Obled C, Attaix D: Muscle wasting in a rat model of long - lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺ - activated, and ubiquitin - proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* **1996**;97(7):1610-1617
152. Wang L, Lus G-J, Wang JJ, Hasselgren P-O: Dexamethasone stimulates proteasome- and calcium-dependent proteolysis in cultured L6 myotubes. *Shock* **1998**;10:298-306
153. Wassner SJ, Schlitzer L, Li JB: A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* **1980**;104:284-9
154. Weissman AM: Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**;2(3):169-78
155. Wójcik C, DeMartino GN: Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* **2003**;35(5):579-89

156. Wusteman M, Wight DG, Elia M: Protein metabolism after injury with turpentine: a rat model for clinical trauma. *Am J Physiol* **1990**;259(6 Pt 1),E763–E769
157. Yang H, Chen D, Cui QC, Yuan X, Dou QP: Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res* **2006**;66(9):4758-65
158. Yang H, Shi G, Dou QP: The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry". *Mol Pharmacol* **2007**;71(2):426-37
159. Yeung BHY, Huang DC, Sinicrope FA: PS-341 (Bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* **2006**;281(17):11923-11932
160. Zarrabian S, Attaix D, Marcy J, Biou D, Mendy F, Roger L, Cezard JP: Effects of alimentary whole proteins versus their small peptide hydrolysates on liver and skeletal muscle during the acute inflammation phase in the rat. *Clin Nutr* **1998**;17:169-176

8 SOUHRN

Kosterní sval představuje hlavní zdroj aminokyselin v různých zátěžových situacích. Závažné a dlouhodobé patologické stavy jako sepse, popáleniny nebo onkologická onemocnění vedou k inhibici svalové proteosyntézy a zejména k aktivaci proteolýzy. Tyto procesy sice zajišťují organizmu přísun aminokyselin nutných k uzdravení, avšak trvají-li příliš dlouho či probíhají-li v nadměrném rozsahu, vedou k progresivním ztrátám svalové hmoty, rozvoji kachexie a v konečném důsledku ke zpomalení rekonvalescence a zvýšení mortality.

Hlavní intracelulární proteolytický mechanismus je ubiquitin-proteazomový systém (UPS). Tento systém je zapojen v regulaci celé řady buněčných pochodů a je zodpovědný za zvýšenou degradaci svalových bílkovin u různých zátěžových stavů. Význam UPS dokládá také fakt, že za jeho objev byla v roce 2004 udělena Nobelova cena.

Snaze farmakologicky ovlivnit UPS se věnuje značná pozornost. Jednu z možností představují inhibitory proteazomu (IP). Nejvýraznějších úspěchů bylo zatím dosaženo u bortezomibu, který je dnes jediným IP běžně používaným v klinické praxi. Fakt, že je indikován při recidivujícím mnohačetném myelomu, koncentruje výzkum v oblasti inhibitorů proteazomu do oblasti onkologie. Méně pozornosti už je věnováno jiným potenciálním efektům IP, mezi něž patří i mírnění nadměrných ztrát svalové hmoty v důsledku závažných, dlouhodobých onemocnění.

Cílem naší práce bylo porovnat syntézu a degradaci proteinů v různých typech kosterních svalů ve dvou odlišných proteokatabolických stavech a posoudit vliv IP belaktosinu A, C a bortezomibu na tyto procesy.

V předkládané práci byla využita metoda inkubace izolovaných svalů laboratorního potkana, která umožňuje posouzení přímého vlivu testovaných látek na kosterní sval. Vzhledem k strukturním a biochemickým rozdílům mezi různými svaly jsme použili m. soleus (SOL), který je složen převážně z oxidativních vláken a m. extensor digitorum longus (EDL) tvořený zejména vlákny glykolytickými. Sledovali jsme aktivitu UPS a katepsinů, celkovou a myofibrilární proteolýzu, proteosyntézu a oxidaci leucinu. Vliv belaktosinů A a C byl sledován pouze *in vitro*, vliv bortezomibu také *in vivo*. Při studiu metabolických rozdílů mezi SOL a EDL jsme indukovali potkanům zánět buď subkutánním podáním terpentýnového oleje nebo intraperitoneální aplikací

endotoxinu, při sledování účinků bortezomibu jsme využili již jen komplexnější endotoxinový model sepse.

Z pohledu přeměny proteinů a aminokyselin byl SOL metabolicky aktivnějším svačem než EDL. Terpentýnem indukovaný zánět provázela inhibice proteosyntézy a aktivace proteolýzy ve sledovaných kosterních svačích. V EDL došlo oproti SOL k výraznější aktivaci CHTLA a inhibici proteosyntézy. Obdobné ale intenzivnější změny jsme pozorovali také po aplikaci endotoxinu s výjimkou CHTLA proteazomu stimulované více v SOL. Tyto rozdíly zřejmě souvisí se strukturálními a biochemickými odlišnostmi mezi EDL a SOL.

Belaktosiny A a C zredukovaly CHTLA proteazomu a celkovou proteolýzu v izolovaných svačích, což poukazuje na zásadní úlohu UPS při degradaci bílkovin. Strukturální odlišnost testovaných belaktosinů se projevila rozdílným účinkem na myofibrilární proteolýzu. Belaktosin A ji snížil, zatímco belaktosin C tento parametr neovlivnil. Lze tedy tvrdit, že rychlost myofibrilární proteolýzy nesouvisí výhradně s činností UPS. Zaznamenali jsme také rozdíly v účinku v závislosti na typu svalů. Belaktosiny stimulovaly oxidaci leucinu jen v SOL a inhibovaly proteosyntézu pouze v EDL.

Bortezomib měl minimální účinky na veškeré sledované parametry ve svačích intaktních potkanů. Na druhou stranu inhiboval zvýšenou CHTLA proteazomu ve svačích septických potkanů jak při podání *in vivo* tak *in vitro*, což dokazuje jeho přímou interakci s UPS. Avšak celková a myofibrilární proteolýza se ve svačích septických zvířat po podání bortezomibu zvýšila, což ukazuje na stimulační účinek na jiné proteolytické mechanismy. Uvážíme-li navíc ambivalentní efekt bortezomibu na proteosyntézu, je zřejmé, že bortezomib v našich podmínkách nemohl zabránit rozvoji negativní proteinové bilance způsobené septickým stavem.

9 SUMMARY

Skeletal muscles are known to serve as the main source of amino acids in various pathological conditions. Severe illnesses as sepsis, burn injury or cancer lead to the inhibition of muscle protein synthesis and particularly to the activation of proteolysis. These mechanisms provide to the organism amino acids that are indispensable for recovery. On the other hand if they persist or occur in excess, they result in progressive loss of muscle mass, cachexia development and in final to moderate convalescence and increase in mortality.

Ubiquitin-proteasome system (UPS) represents the main intracellular mechanism for protein degradation and thus is essential for many cellular processes including increased degradation of muscle proteins in various pathological conditions. In 2004, the discovery of UPS was awarded with Nobel Prize.

Importance of UPS started intensive studies of large spectrum of proteasome inhibitors (IP). To date, the first and only IP in clinical practice is bortezomib, which is used as chemotherapy agent in the treatment of multiple myeloma. This fact concentrates the majority of studies in the field of oncology and less attention is paid to other possibilities of IP exploitation, among them to moderate muscle wasting as a result of severe, long-term illness.

The aim of my doctoral thesis was to compare synthesis and degradation of proteins in different types of skeletal muscles in two distinct catabolic states and consider the influence of IP belactosin A, C and bortezomib on mentioned processes.

We used isolated muscles of laboratory rat to measure the direct influence of compounds tested on skeletal muscle. Regarding different structural and biochemical properties of muscles, we used m. soleus (SOL) predominantly composed of oxidative fibres and m. extensor digitorum longus (EDL) composed of glycolytic fibres. We studied the activity of UPS and cathepsins, total and myofibrillar proteolysis, protein synthesis and leucine oxidation. The influence of belactosins A and C was studied only under *in vitro* conditions, whereas the influence of bortezomib also *in vivo*. To evaluate metabolic differences between SOL and EDL we induced the inflammation either by subcutaneous turpentine administration or by endotoxin application. To evaluate effect of bortezomib we employed just the more complex endotoxin-based model of sepsis.

Regarding protein metabolism, SOL is considered to be more active than EDL. Turpentine induced inflammation was accompanied by protein synthesis inhibition and proteolysis activation in observed skeletal muscles. CTLA of proteasome and protein synthesis were less affected in SOL compared to EDL. Changes following endotoxin administration were similar but more pronounced. The only exception was CTLA of proteasome which was more activated in SOL compared to EDL. This can be due to differences in both structural and biochemical properties of EDL and SOL.

In agreement with the concept of the substantial role of UPS in skeletal muscles degradation, total proteolysis was decreased, as was CTLA of proteasome after the incubation with both belactosin A and C. We found a decrease in myofibrillar proteolysis in both SOL and EDL incubation with belactosin A, while exposure to belactosin C failed to affect this parameter. Therefore rate of myofibrillar proteolysis is not only a function of UPS. Belactosin A and C affected basic parameters of protein metabolism and the response is both belactosin- and muscle-type-dependent as increase in leucin oxidation occurred only in SOL, whereas protein synthesis inhibition in EDL.

Bortezomib had no significant effect in healthy rats. On the other hand, it increases CTLA in muscles of septic rats after *in vivo* as well as *in vitro* administration, thus bortezomib affects proteolysis and protein synthesis mainly via direct interaction with UPS. However total and myofibrillar proteolysis in muscles of septic rats increased, which shows its stimulating effect on other proteolytical mechanisms. Moreover, bortezomib exhibited ambivalent effect on protein synthesis in skeletal muscle of septic rats, thus its protective effect on muscle mass during catabolic conditions could not be confirmed.

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha 1: Obrazová dokumentace k metodické části



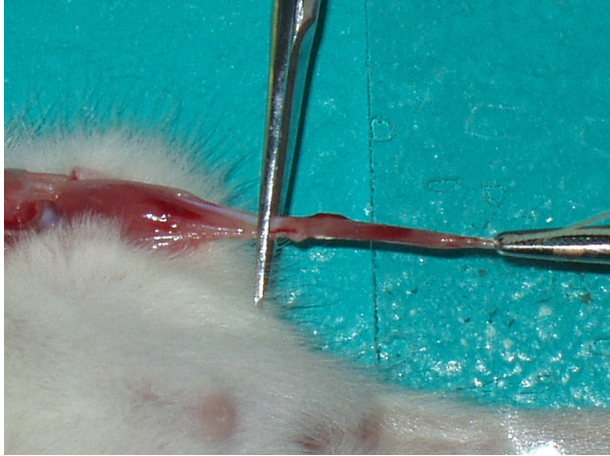
Obr. 1. Fixace potkana na operačním stolku.



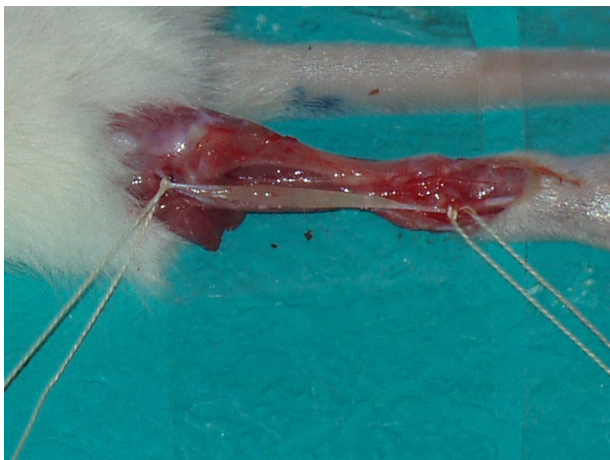
Obr. 2. Odkrytí svaloviny zadní končetiny.



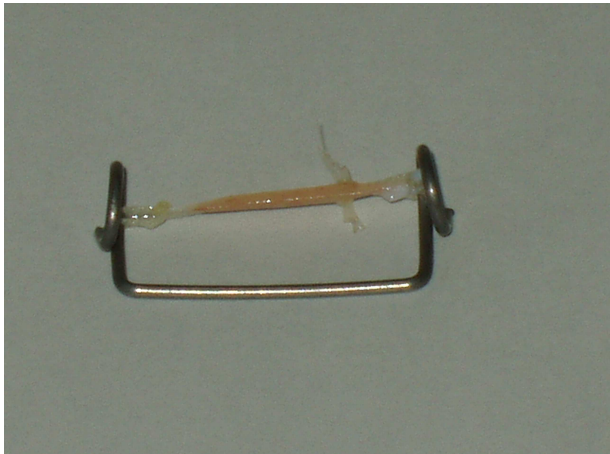
Obr. 3. Flexe zadních končetin a podvaz Achilovy šlachy.



Obr. 4. Izolace m. soleus.



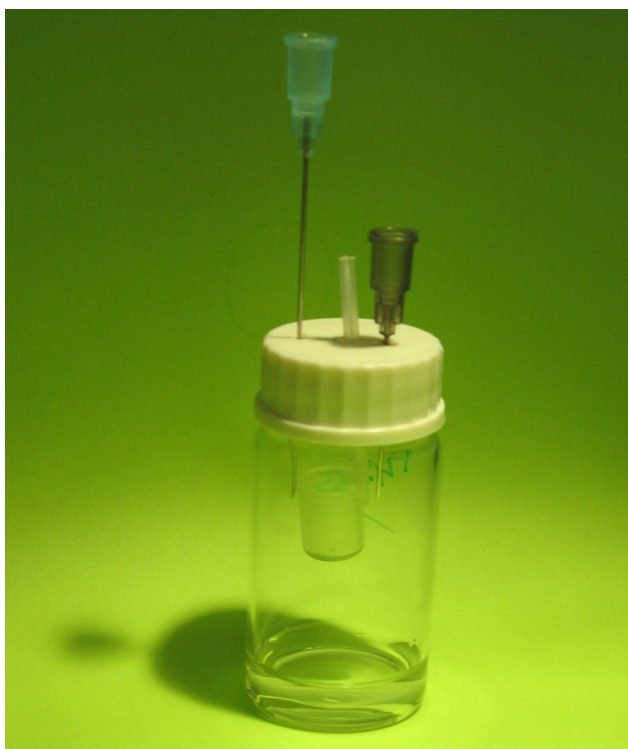
Obr. 5. Izolace m. extensor digitorum longus.



Obr. 6. Zajištění tenze izolovaného svalu.



Obr. 7. Inkubační lahvička.



Obr. 8. Inkubační lahvička s kelímkem.

10.2 Příloha 2: Publikované práce

10.2.1 In extenso

- 10.2.1.1 Muthny T, Kovarik M, Sispera L, de Meijere A, Larionov OV, Tilser I, Holecek M: The effect of new proteasome inhibitors, belaktosin A and C, on protein metabolism in isolated rat skeletal muscle. *J Physiol Biochem* 2009;65(2),137-146**

The effect of new proteasome inhibitors, belactosin A and C, on protein metabolism in isolated rat skeletal muscle

T. Muthny¹, M. Kovarik², L. Sispera², A. de Meijere³, O.V. Larionov³,
I. Tilser¹ and M. Holecek²

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy; ²Department of Physiology, Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic;

³Institute for Organic and Biomolecular Chemistry, Georg-August University, Goettingen, Germany

(Received on December, 2008)

T. MUTHNY, M. KOVARIK, L. SISPERA, A. DE-MEIJERE, O.V. LARIONOV, I. TILSER and M. HOLECEK. *The effect of new proteasome inhibitors, belactosin A and C, on protein metabolism in isolated rat skeletal muscle.* J Physiol Biochem, 65 (2), 137-146, 2009.

The proteasome inhibitors are used as research tools to study of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome system. Some of them are at present undergoing clinical trials to be used as therapeutic agents for cancer or inflammation. These diseases are often accompanied by muscle wasting. We herein demonstrate findings about new proteasome inhibitors, belactosin A and C, and their direct effect on protein metabolism in rat skeletal muscle. M. soleus (SOL) and m. extensor digitorum longus (EDL) were dissected from both legs of male rats (40-60g) and incubated in a buffer containing belactosin A or C (30 μ M) or no inhibitor. The release of amino acids into the medium was estimated using high performance liquid chromatography to calculate total and myofibrillar proteolysis. Chymotrypsin-like activity (CTLA) of proteasome and cathepsin B, L activity were determined by fluorometric assay. Protein synthesis and leucine oxidation were detected using specific activity of L-[1-¹⁴C] leucine added to medium. Inhibited and control muscles from the same rat were compared using paired t-test. The results indicate that after incubation with both belactosin A and C total proteolysis and CTLA of proteasome decreased while cathepsin B, L activity did not change in both SOL and EDL. Leucine oxidation was significantly enhanced in SOL, protein synthesis decreased in EDL. Myofibrillar proteolysis was reduced in both muscles in the presence of belactosin A only. In summary, belactosin A and C affected basic parameters of protein metabolism in rat skeletal muscle. The response was both muscle- and belactosin-type-dependent.

Key words: Belactosin, Proteases, Proteasome, Skeletal muscle.

The ATP-dependent ubiquitin-proteasome system (UPS) is the intracellular proteolytic machinery localized in the cytosol and nucleus. Proteins to be degraded are mostly tagged by the polyubiquitin chain in a process regulated by ubiquitinating and deubiquitinating enzymes (1). Subsequent proteolysis is performed in a 26S proteasome consisting of a 20S central cylindrical component and one or two 19S regulatory units with ATPase activity and ubiquitin-recognizing sites. The 20S core is organized as a stack of four rings formed by seven subunits (28). The two inner rings are composed of β -subunits, which form a hydrolytic chamber, whereas the outer subunit rings are essential for the assembly and substrate gating (15). On β -subunits, there are at least three well-characterized active sites with cleavage activities referred to as chymotrypsin-like (CTLA), trypsin-like, and post-glutamyl peptide hydrolyzing activity (12).

The UPS is an important proteolytic pathway involved in many intracellular processes. Levels of cyclins during the cell cycle are regulated due to the degradation mediated by the UPS (13, 26). Similarly, the generation of antigenic peptides, and consequently their presentation, is affected by the UPS activity (11, 29). Although there is evidence for the involvement of several regulatory mechanisms in the breakdown of myofibrillar proteins, it is thought that protein degradation in skeletal muscle occurs primarily through the UPS (21). Atrophy of skeletal muscle via UPS activation is common complication to a number of serious disorders. Thus, the UPS represents an appropriate therapeutic target to prevent muscle wasting (35). Considering these facts, the research has recently been focused on the develop-

ment of new proteasome inhibitors (PIs) as therapeutic agents.

In the course of a microbial screening programme, the new structurally unique *Streptomyces* metabolites, belactosins, were identified. These substances were referred to as potential new anti-tumour agents with inhibitory effect on proteasome (3). Consequently, methods for the total syntheses of belactosin A, C and a homoanalogue of belactosin C have been developed (5, 20). As belactosin A and C as well as their benzyl-diprotected forms are promising agents for the treatment of cancer, which is often attended by muscle wasting, the aim of our study was to provide basic information about their effect on protein and amino acid metabolism in isolated skeletal muscle of intact rat.

Material and Methods

Animals.— Male Wistar rats (body weight 40–60 g) obtained from BioTest, Konarovice, CZ, were used in this study. The rats were housed under controlled conditions (12-h light-dark cycle, 22 °C, 55–65% relative humidity) with free access to standard laboratory chow and water. All procedures involving animal manipulation were performed in accordance with guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University, Prague, CZ.

Materials.— Armin de Meijere and Oleg Larionov synthesized belactosin A and C in their benzyl-diprotected forms (Fig. 1). L-[1-¹⁴C]leucine was purchased from GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, GB); amino acids, cycloheximide, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Suc-LLVY-MCA), N-Cbz-Phe-Arg-7-amido-4-methyl-

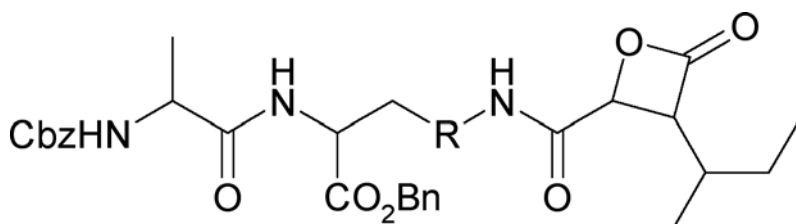


Fig. 1 Chemical structure of belactosins.

Diprotected belactosin A (R=C₃H₄); Diprotected belactosin C (R=C₂H₄); Cbz, benzyloxycarbonyl; Bn, benzyl.

coumarin hydrochloride (Z-FA-MCA), N-Cbz-Phe-Phe-fluoromethyl ketone (Z-FF-FMK) and albumin were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, US); hydroxide of hyamine from Packard Instruments (Meriden, CT, US); Aminoplasmal 15 from B. Braun Medicals (Melsungen, DE); MG132 from Biomol (Hamburg, DE). The remaining chemicals were obtained from Sigma Chemicals (St Louis, MO, US), Waters (Milford, MA, US), and Lachema (Brno, CZ).

Muscle incubation.— Rats were anaesthetized with pentobarbital (6 mg/100 g body weight, i.p.) and blood was withdrawn from the bifurcation of aorta. Soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles of both legs were dissected as described (25). Isolated muscles were fixed to stainless steel clips to provide slight tension and immediately transferred to 2.5 ml of modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (in mM: 144 Na⁺; 4.2 K⁺; 0.8 Mg²⁺; 1.3 Ca²⁺; 122.8 Cl⁻; 26 HCO₃⁻; 0.8 SO₄²⁻; 2 H₂PO₄⁻) with 6 mM glucose and 2 mU/ml insulin (pH 7.4, 37 °C). Other components present in the medium were dependent on the measured parameter. The medium was saturated with O₂/CO₂ (95% / 5%). The muscles were preincubated for 30 min in a thermostatically controlled bath (37 °C) with a shaking device (70 cycles/min) to ensure stable intramuscular concentrations of

components present in the medium. After the preincubation, the muscles were quickly rinsed in 0.9% NaCl, blotted and transferred to a second set of vials containing fresh incubation media identical in composition and volume with the preincubation one. Up to date there are no data about bioavailability of belactosin A and C. Nevertheless, proteasome inhibition activity of belactosin A and C is similar to lactacystin (3), which is usually used in 10–100 μM concentrations. Thus bilateral muscles were individually preincubated and incubated with the addition of 30 μM belactosin A or C, or in a medium with a solvent (dimethylsulfoxide-final concentration 0.1%) respectively. Control and experimental incubations of the same rat were compared. The viability of incubated muscles was previously confirmed in our laboratory (30) as well as by other authors (8).

CTLA of proteasome.— The CTLA of proteasome was determined using the fluorogenic substrate Suc-LLVY-MCA (14) as follows. Following two-hour incubation in the medium for proteolysis (modified Krebs-Henseleit buffer with 0.5 mmol/l cycloheximide), the muscles were homogenized in 0.4 ml of ice-cold 20 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂ and 1 mM dithiothreitol. The homogenates were centrifuged for 10 min at 18 000 g at 4 °C. The cellu-

lar supernatant (0.1 ml) was incubated with 0.1 ml of substrate Suc-LLVY-MCA (0.1 mM), with and without inhibitor MG132 (0.02 mM), for 1 h on ice. Adding 0.4 ml of 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.3, stopped the reaction. The fluorescence of the samples was immediately determined at the excitation wavelength of 340 nm and the emission wavelength of 440 nm (Perkin Elmer luminescence spectrometer LS 50 B). The standard curve was established for 7-amino-4-methylcoumarin, which permitted the expression of CTLA as nmol of 7-amino-4-methylcoumarin/g protein/hour. The activity was adjusted for the protein concentration of the supernatant estimating according to LOWRY (24). The differences after the subtraction of inhibited from non-inhibited activities were used for the calculations.

Cathepsin B, L activity.— The activity of cathepsin B, L was determined using the fluorogenic substrate Z-FA-MCA [19, 32] as follows. The muscles were incubated for two hours in the medium for proteolysis and homogenized in 0.6 ml ice-cold 300 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, containing 4 mM EDTA, 8 mM dithiothreitol and 0.2 % Triton X-100 (v/v). The homogenates were allowed to stand for 30 min on ice and then centrifuged for 30 min at 18 000 g at 4 °C. The cellular supernatant (0.01 ml) was incubated with 0.2 ml of substrate Z-FA-MCA (0.1 mM), with and without inhibitor Z-FF-FMK (0.04mM). After a 30min incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 1ml of 100mM sodium acetate buffer, pH 4.3, and the activity of cathepsin B, L was determined as described above for CTLA.

Total and myofibrillar proteolysis.— The total and myofibrillar protein breakdown was estimated after a two-hour incubation

of the muscle in medium for proteolysis, which prevented the reincorporation of the released amino acids into the proteins. Since tyrosine is neither synthesized nor degraded in the skeletal muscle and since the intracellular pool of tyrosine remains constant during incubation (10), its amount released into the medium reflects total proteolysis in the muscle. The amount of 3-methylhistidine, a characteristic product of the myofibrillar breakdown, released into the medium, served for the myofibrillar proteolysis calculation. The rates of amino acid release were estimated based on their respective concentrations in the medium and the weight of the muscle. 3-methylhistidine was quantified using a high performance liquid chromatography method (Waters, MA, USA) based on the reaction with fluorescamine (23, 37) amino acid concentrations in the medium were determined by a high performance liquid chromatography method after a precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (6, 27).

Leucine oxidation and protein synthesis.— Leucine oxidation and protein synthesis were measured after an one-hour incubation of the muscle in 2.5 ml of modified Krebs-Henseleit bicarbonate medium enriched with amino acids in approximately physiological concentrations (Aminoplasmal 15 with added glutamine, tyrosine, threonine, serine, lysine, cysteine and asparagine in total concentration 2.8 mM) and [$1\text{-}^{14}\text{C}$]leucine (0.6 $\mu\text{Ci/ml}$). The final concentration of labelled and unlabelled leucine was 150 μM . The one-hour (shortened) incubation was performed to minimize the bias of results via degradation of proteins. At the end of the incubation period, 0.4 ml of hydroxide of hyamine was added to the container hanging above the incubation medium. The

reaction was stopped by the addition of a 35% (v/v) perchloric acid solution (0.2 ml) into the incubation medium, and the flasks were shaken for one hour to ensure complete absorption of $^{14}\text{CO}_2$ into the hyamine hydroxide. The muscles were removed from the incubation flasks, quickly rinsed in cold 6% (v/v) HClO_4 , blotted, and homogenized in 0.6 ml of 6% (v/v) perchloric acid. The homogenate was centrifuged for 5 min at 12 000 g, and the pellet was used for other measurements. The L-[1- ^{14}C]leucine incorporation into the precipitated proteins was estimated after their hydrolysis in 1 M NaOH. Leucine oxidation and protein synthesis were calculated using leucine specific activity in the incubation medium and expressed as nmol of oxidized Leu/g wet weight/hour and nmol of incorporated leucine/g protein/hour, respectively. The radioactivity of the samples was measured with the liquid scintillation radioactivity counter LS 6000 (Beckman Instruments, CA, USA). The protein content of the samples was estimated according to LOWRY (24).

Statistical analysis.— The results are expressed as the mean \pm SEM. Paired *t*-test (statistical software NCSS 2001) has been used for the analysis of the data. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

CTLA of proteasome and cathepsin B, L activity.— As described in Table I and II, both inhibitors caused a significant reduction of CTLA of proteasome while cathepsin B, L activity was not affected both in SOL and EDL.

Total and myofibrillar proteolysis.— The addition of both belactosin A and C into the incubation medium significantly decreased the total proteolysis in both SOL and EDL (Table I and II). Myofibrillar proteolysis was significantly lowered in both types of muscle only after incubation with belactosin A (Table I).

Leucine oxidation and protein synthesis.— Both belactosin A and C induced a

Table I. Effect of belactosin A on basic parameters of protein and amino acid metabolism.

	SOL _{A-}	SOL _{A+}	EDL _{A-}	EDL _{A+}
CTLA of proteasome (n=8) (nmol AMC/g of protein/h)	1150 \pm 61	679 \pm 44*	1206 \pm 119	1022 \pm 64*
Cathepsin B,L activity (n=8) (μ mol AMC/g of protein/h)	328 \pm 35	341 \pm 16	278 \pm 26	240 \pm 21
Total proteolysis (n=10) (nmol TYR/g wet wt/h)	273 \pm 14	198 \pm 8*	140 \pm 4	105 \pm 3*
Myofibrillar proteolysis (n=10) (nmol 3MH/g wet wt/h)	1.260 \pm 0.043	1.098 \pm 0.049*	0.756 \pm 0.024	0.613 \pm 0.024*
Leucine oxidation (n=8) (nmol LEU/g wet wt/h)	72 \pm 7	88 \pm 8*	80 \pm 13	89 \pm 6
Protein synthesis (n=8) (nmol LEU/g of protein/h)	1905 \pm 92	1757 \pm 86	1573 \pm 86	1425 \pm 63*

Mean \pm SEM; Paired *t*-test; * $P < 0.05$ vs. control. Control groups (A-) are compared to the groups consisting of contralateral muscles incubated with belactosin A (A+). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus.

Table II. Effect of belactosin C on basic parameters of protein and amino acid metabolism.

	SOL _{C-}	SOL _{C+}	EDL _{C-}	EDL _{C+}
CTLA of proteasome (n=8) (nmol AMC/g of protein/h)	1236±86	789±62*	1475±94	1015±66*
Cathepsin B,L activity (n=8) (µmol AMC/g of protein/h)	298±26	259±27	285±31	197±21
Total proteolysis (n=10) (nmol TYR/g wet wt/h)	258±7	230±8*	135±5	112±6*
Myofibrillar proteolysis (n=10) (nmol 3MH/g wet wt/h)	1.122±0.101	1.157±0.096	0.588±0.037	0.528±0.035
Leucine oxidation (n=8) (nmol LEU/g wet wt/h)	64±5	79±7*	75±12	91±5
Protein synthesis (n=8) (nmol LEU/g of protein/h)	1924±90	1769±83	1580±87	1447±66*

Mean ± SEM; Paired t-test; *P<0.05 vs. control. Control groups (C-) are compared to the groups consisting of contralateral muscles incubated with belactosin C (C+). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus.

Table III. Effect of belactosin A on the release of amino acids into the medium (nmol/g w. w./hour).

	SOL _{A-}	SOL _{A+}	EDL _{A-}	EDL _{A+}
Ala	1121 ± 67	1034 ± 42	679 ± 37	594 ± 40*
Asn	295 ± 26	244 ± 17*	139 ± 6	117 ± 5*
Gln	2037 ± 124	1944 ± 97	1307 ± 42	1166 ± 19*
Glu	424 ± 53	385 ± 45	174 ± 21	149 ± 13
Gly	1023 ± 59	876 ± 53	582 ± 30	498 ± 29*
His	333 ± 22	293 ± 13	165 ± 6	141 ± 6*
Ile	324 ± 14	241 ± 8*	197 ± 10	158 ± 8*
Leu	590 ± 27	429 ± 15*	289 ± 11	219 ± 10*
Lys	690 ± 52	560 ± 26*	430 ± 23	375 ± 18*
Met	168 ± 9	125 ± 6*	84 ± 3	65 ± 4*
Phe	308 ± 17	227 ± 11*	149 ± 5	120 ± 6*
Pro	597 ± 34	477 ± 38*	346 ± 13	282 ± 9*
Ser	992 ± 102	868 ± 80	530 ± 29	430 ± 24*
Tau	570 ± 148	613 ± 139	286 ± 66	255 ± 41
Val	473 ± 25	359 ± 14*	227 ± 8	178 ± 8*
Total AA	10158 ± 669	8757± 422	5724 ±187	4852 ± 148*

Mean ± SEM, n=10 in each group. Paired t-test; *P < 0.05 vs. control. Media of control muscles (A-) are compared to media of contralateral muscles incubated with belactosin A (A+). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus, Total AA, sum of all measured amino acids.

significant increase in leucine oxidation in SOL, whereas in EDL this parameter remained unchanged. In contrast, both

inhibitors decreased protein synthesis in EDL without a significant effect on the SOL muscle (Tables I and II).

Amino acid release into the incubation medium.— Table III represents the rates of amino acid release from SOL and EDL into the medium after the incubation with belactosin A. The release of most of the amino acids (except glutamic acid and taurine) decreased in EDL, resulting in total amino acid release reduction. In SOL, a decrease in Asn, Pro, Val, Met, Ileu, Leu, Lys and Phe release was detected. After the belactosin C treatment (Table IV), the release of Val, Met, Ileu, Leu and Phe was reduced in both muscles. Additionally, a decrease in Asn, Ala, Pro, Lys and total amino acids was observed in EDL only.

Discussion

The addition of both belactosin A and C inhibited CTLA of proteasome in both SOL and EDL. We did not observe a significant change in cathepsin B, L activity

following the belactosin treatment. This indicates that belactosin A and C affect CTLA of proteasome similar to most of the known PIs. Additionally, we provide evidence that belactosin A and C does not inhibit cathepsin B, L activity in skeletal muscle, partially indicating their proteasome specificity. This corresponds with the findings demonstrating that the analogue of belactosin A, KF33955, has a weak effect on other proteases such as elastase, IL-1 β converting enzyme and cathepsin B (3).

In agreement with the concept of the substantial role of UPS in skeletal muscle protein degradation, total proteolysis was decreased, as was CTLA of proteasome. The incubation with both belactosin A and C significantly reduced the total proteolysis both in SOL and EDL. Similar results were published after the incubation with AdaAhx₃L₃VS (18) and lacta-

Table IV. Effect of belactosin C on the release of amino acids into the medium (nmol/g w. w./hour).

	SOL _{C-}	SOL _{C+}	EDL _{C-}	EDL _{C+}
Ala	1157 \pm 53	1098 \pm 56	616 \pm 19	451 \pm 20*
Asn	307 \pm 11	302 \pm 15	118 \pm 2	102 \pm 5*
Gln	2013 \pm 58	1997 \pm 56	1220 \pm 41	1106 \pm 50
Glu	488 \pm 38	568 \pm 27	154 \pm 17	153 \pm 18
Gly	897 \pm 29	875 \pm 32	489 \pm 26	455 \pm 30
His	313 \pm 12	308 \pm 11	166 \pm 13	140 \pm 13
Ile	307 \pm 8	261 \pm 9*	155 \pm 6	117 \pm 7*
Leu	586 \pm 17	494 \pm 16*	299 \pm 12	225 \pm 11*
Lys	817 \pm 27	763 \pm 43	498 \pm 14	457 \pm 21*
Met	169 \pm 5	147 \pm 6*	79 \pm 3	61 \pm 3*
Phe	303 \pm 9	267 \pm 9*	149 \pm 5	123 \pm 6*
Pro	649 \pm 19	593 \pm 22	356 \pm 12	297 \pm 11*
Ser	892 \pm 63	892 \pm 76	404 \pm 30	379 \pm 34
Tau	599 \pm 89	699 \pm 72	146 \pm 25	213 \pm 59
Val	463 \pm 13	404 \pm 14*	234 \pm 13	181 \pm 10*
Total AA	10218 \pm 320	9899 \pm 378	5217 \pm 158	4571 \pm 222*

Mean \pm SEM, n=10 in each group. Paired t-test; *P < 0.05 vs. control. Media of control muscles (C-) are compared to media of contralateral muscles incubated with belactosin C (C+). SOL-m. soleus, EDL-m. extensor digitorum longus, Total AA, sum of all measured amino acids.

cystin (9). In other studies evaluating the effect of MG132 on skeletal muscle of intact rats, as high as a 50% reduction of the total proteolysis was registered (4, 33).

Regarding the myofibrillar proteolysis, we found a decrease in both SOL and EDL incubated with belactosin A, while exposure to belactosin C failed to affect this parameter. These findings are in agreement with decreased 3-methylhistidine release following the treatment of C₂C₁₂ myotubes with MG132 (34). However, no impact of lactacystine on this parameter was observed (9). It has been demonstrated that myofibrils cannot be cleaved by proteasome itself (31). However, other proteases (e.g. caspase-3) disintegrate myofibrils and make actin and myosin accessible for proteasomal cleaving (7). We therefore hypothesize that the different effects of belactosin A and C on the myofibrillar proteolysis may be caused by different protease specificity.

As the removal of leucine reduces protein synthesis through changes in translation initiation factors eIF2B and eIF4E (36), and leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle (2), we estimated the effect of belactosins on leucine oxidation. This parameter was enhanced in the presence of both belactosin A and C in SOL. In EDL, leucine oxidation tended to increase, however no significant changes were verified. This is partly in conflict with the findings of increase in leucine oxidation after the AdaAhx₃L₃VS treatment in both muscle types (18) and decrease in this parameter in EDL following an MG132 exposure (17). As the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase is the rate-limiting enzyme of leucine catabolism (22), one of possible explanations of increased leucine oxidation is, that the enzyme might be induced by belactosins.

In EDL, protein synthesis decreased significantly both in the presence of belactosin A and C without a significant effect in SOL. These data correspond with those reporting a lowering of protein synthesis in EDL following an LLnL treatment (16). Similar changes both in EDL and SOL were observed using MG132 and AdaAhx₃L₃VS, respectively (17, 18). In contrast, LLnL has no effect on protein synthesis in incubated diaphragm (33). The reduction of protein synthesis in EDL can be related to neither enhance leucine oxidation nor to decreased supply of amino acids due to the lowered proteolysis (see above). Therefore, we hypothesize that belactosin A and C reduced the skeletal muscle protein synthesis via an unknown mechanism.

The total amino acid release was decreased in the presence of both belactosins in EDL and did not change in SOL. A similar effect of AdaAhx₃L₃VS was demonstrated in both muscle types (17). We assume that this effect reflects a muscle-type-dependent response to belactosins rather than a decrease in total proteolysis. However, the changes in amino acid concentrations in the incubation medium should be interpreted carefully with respect to the fact that the amino acid release from the muscle to the medium can be contributed by degradation of both structural proteins and enzymes, changes in transport mechanisms, re-synthesis and catabolism of some amino acids, and binding to cell structures.

We conclude that the effect of belactosins on protein and amino acid metabolism in isolated skeletal muscles of intact rats exhibits some differences compared to the other known PIs. Belactosin A and C differ in action on myofibrillar proteolysis and their impact on protein synthesis and leucine oxidation is muscle-type

dependent. These promising findings were obtained on isolated muscles of healthy rats and provide no data about effect of belactosins *in vivo*. As belactosins are prospective agents for treatment of cancer, their putative effect on cancer-related skeletal muscle wasting should be investigated on appropriate animal models.

Acknowledgements

This study was funded by Research Project MSM 0021620820. We are grateful for the methodical consultation to J. Chladek, MSc., PhD, for the proof reading to J. Pivnickova and for the technical support to R. Rysava and H. Buzkova.

T. MUTHNY, M. KOVARIK, L. SISPERA, A. DE-MEIJERE, O.V. LARIONOV, I. TILSER y M. HOLECEK. *Efecto de belactosina A y C sobre el metabolismo proteico en músculo esquelético aislado de rata*. *J Physiol Biochem*, **65** (2), 137-146, 2009.

References

1. Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (2004): Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 189-207.
2. Anthony, J.C., Yoshizawa, F., Anthony, T.G., Vary, T.C., Jefferson, L.S. and Kimball, S.R. (2000): Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr*, **130**, 2413-2419.
3. Asai, A., Tsujita, T., Sharma, S.V. *et al.* (2004): A new structural class of proteasome inhibitors identified by microbial screening using yeast-based assay. *Biochem Pharmacol*, **67**, 227-234.
4. Bailey, J.L., Wang, X., England, B.K., Price, S.R., Ding, X. and Mitch, W.E. (1996): The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP - dependent ubiquitin - proteasome pathway. *J Clin Invest*, **97**, 1447-1453.
5. Cho, S.W., Romo, D. (2007): Total synthesis of (-)-belactosin C and derivatives via double diastereoselective tandem Mukaiyama aldol lactonizations. *Org Lett*, **9**, 1537-1540.
6. Cohen, S.A. and Michaud, D.P. (1993): Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, **211**, 279-287.
7. Du, J., Hu, Z. and Mitch, W.E. (2005): Molecular mechanisms activating muscle protein degradation in chronic kidney disease and other catabolic conditions. *Eur J Clin Invest*, **35**, 157-163.
8. Fang, C.H., Li, B.G., James, J.H. *et al.* (2005): Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor and glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Endocrinology*, **146**, 3141-3149.
9. Fang, C.H., Wang, J.J., Hobler, S., Li, B.G., Fischer, J.E. and Hasselgren, P.O. (1998): Proteasome blockers inhibit protein breakdown in skeletal muscle after burn injury in rats. *Clin Sci*, **95**, 225-233.
10. Fulks, R.M., Li, J.B. and Goldberg, A.L. (1975): Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J Biol Chem*, **250**, 290-298.
11. Gaczynska, M., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1993): Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*, **365**, 264-267.
12. Glickman MH, Ciechanover A. (2002): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428.
13. Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991): Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-138.
14. Gomes-Marcondes, M.C.C. and Tisdale, M.J. (2002): Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett*, **180**, 69-74.
15. Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. and Huber, R. (2005): Molecular machines for protein degradation. *Chem-biochem*, **6**, 222-256.
16. Hobler, S.C., Tiao, G., Fischer, J.E., Monaco, J. and Hasselgren, P.O. (1998): Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors. *Am J Physiol*, **274**, R30-37.
17. Kadlcikova, J., Holecck, M., Safranek, R., Tilser, I. and Kessler, B.M. (2004): Effects of proteasome inhibitors MG132, ZL3VS and AdaAhx3 L3VS on protein metabolism in septic rats. *Int J Exp Pathol*, **85**(6): 365-371.
18. Kadlcikova, J., Holecck, M., Safranek, R. and Tilser I. (2005): Direct effects of proteasome

- inhibitor AdaAhx₃L₃VS on protein and amino acid metabolism in rat skeletal muscle. *Physiol Res*, **54**, 541-547.
19. Koochmaraie, M. and Kretchmar, D.H. (1990): Comparisons of four methods for quantification of lysosomal cysteine proteinase activities. *J Anim Sci*, **68**, 2362-2370.
 20. Larionov, O.V. and de Meijere, A. (2004): Enantioselective total syntheses of belactosin A, belactosin C, and its homoanalogue. *Org Lett*, **6**(13), 2153-2166.
 21. Lecker, S.H., Solomon, V., Mitch, W.E. and Goldberg A.L. (1999): Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Nutr*, **129**, 227S-237S.
 22. Lombardo, Y.B., Serdikoff, C., Thamocharan, M., Paul, H.S. and Adibi S.A. (1999): Inverse alterations of BCKA dehydrogenase activity in cardiac and skeletal muscles of diabetic rats. *Am J Physiol*, **277**, E685-692.
 23. Lowell, B.B., Ruderman, N.B. and Goodman, M.N. (1986): Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism*, **35**, 1121-1127.
 24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
 25. Maizels, E.Z., Ruderman, N.B., Goodman, M.N. and Lau D. (1977): Effect of acetoacetate on glucose metabolism in the soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat. *Biochem J*, **162**, 557-568.
 26. Mayer, R.J. (2000): The meteoric rise of regulated intracellular proteolysis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**(2), 145-148.
 27. Reverter, M., Lundh, T. and Lindberg, J.A. (1997): Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **696**(1): 1-8.
 28. Rivett, A.J. (1993): Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J*, **291**, 1-10.
 29. Rock, K.L. and Goldberg A.L. (1999): Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*, **17**, 739-779.
 30. Safranek, R., Holecek, M., Kadlcikova, J. *et al.* (2003): Effect of acute acidosis on protein and amino acid metabolism in rats. *Clin Nutr*, **22**(5), 437-443.
 31. Salomon, V. and Goldberg, A.L. (1996): Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem*, **271**, 26690-26697.
 32. Tardy, C., Autefage, H., Garcia, V., Levade, T. and Andrieu-Abadie, N. (2004): Mannose 6-phosphorylated proteins are required for tumor necrosis factor-induced apoptosis: defective response in I-cell disease fibroblasts. *J Biol Chem*, **279**(51), 52914-52923.
 33. Tawa, N.E. Jr., Odessey, R. and Goldberg, A.L. (1997): Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest*, **100**(1), 197-203.
 34. Thompson, M.G., Thom, A., Partridge, K. *et al.* (1999): Stimulation of myofibrillar protein degradation and expression of mRNA encoding the ubiquitin-proteasome system in C(2)C(12) myotubes by dexamethasone: effect of the proteasome inhibitor MG-132. *J Cell Physiol*, **181**(3), 455-461.
 35. Tisdale, M.J. (2005): The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting. *J Support Oncol*, **3**, 209-217.
 36. Vary, T.C., Jefferson, L.S. and Kimball, S.R. (1999): Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*, **277**, E1077-1086.
 37. Wassner, S.J., Schlitz, L. and Li, J.B. (1980): A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem*, **104**, 284-289.

10.2.1.2 Muthny T, Kovarik M, Sispera L, Tilser I, Holecek M: Protein metabolism in slow- and fast-twitch skeletal muscle during turpentine-induced inflammation. *Int J Exp Pathol* 2008;89(1):64-71

Protein metabolism in slow- and fast-twitch skeletal muscle during turpentine-induced inflammation

Tomas Muthny*, Miroslav Kovarik†, Ludek Sispera†, Ivan Tilser* and Milan Holecek†

*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic and

†Department of Physiology, Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY

Received for publication:
15 November 2006
Accepted for publication:
12 June 2007

Correspondence:

Tomas Muthny
Department of Pharmacology and
Toxicology
Faculty of Pharmacy
Charles University
Heyrovskeho 1203
500 05 Hradec Kralove
Czech Republic
Tel.: +420 495067111
Fax: +420 495518002
E-mail: muthnyt@faf.cuni.cz

Summary

The aim of our study was to evaluate the differences in protein and amino acid metabolism after subcutaneous turpentine administration in the soleus muscle (SOL), predominantly composed of red fibres, and the extensor digitorum longus muscle (EDL) composed of white fibres. Young rats (40–60 g) were injected subcutaneously with 0.2 ml of turpentine oil/100 g body weight (inflammation) or with the same volume of saline solution (control). Twenty-four hours later SOL and EDL were dissected and incubated in modified Krebs–Heinseleit buffer to estimate total and myofibrillar proteolysis, chymotrypsin-like activity of proteasome (CHTLA), leucine oxidation, protein synthesis and amino acid release into the medium. The data obtained demonstrate that in intact rats, all parameters measured except protein synthesis are significantly higher in SOL than in EDL. In turpentine treated animals, CHTLA increased and protein synthesis decreased significantly more in EDL. Release of leucine was inhibited significantly more in SOL. We conclude that turpentine-induced inflammation affects more CHTLA, protein synthesis and leucine release in EDL compared to SOL.

Keywords

amino acids, fast-twitch, inflammation, leucine, proteasome, protein synthesis, proteolysis, slow-twitch

There are two basic types of skeletal muscle fibres (I and II) which differ in both physical and biochemical properties due to alternate expression of myosin heavy chain (MHC) isoforms (Rivero *et al.* 1996). According to the dominantly expressed MHC isoform, they may be further divided into subtypes I, IC, IIC, IIA, IIAD, IID, IIDB and IIB. However, many fibres co-express different MHC isoforms in variable relative amounts, forming a continuum (Sant'ana Pereira *et al.* 1995). In general, type I fibres have small diameters (Rivero *et al.* 1998), they contain

higher levels of mitochondria and myoglobin, their contraction is more prolonged, their twitch rate is slower (Schiaffino & Reggiani 1996), they have more capillaries than type II fibres do and the main source of energy is blood glucose and free fatty acids. Type II fibres are thicker, they contain higher levels of myosin ATPase, their contraction is stronger and faster, muscle glycogen serves as the basic source of energy and the resistance to fatigue is not so high as in the case of type I fibres. With respect to these properties, type I fibres are also called red,

oxidative or slow-twitch fibres and type II fibres white, glycolytic or fast-twitch fibres.

Skeletal muscles have variable numbers of fast-twitch and slow-twitch fibres, the relative amounts are appropriately related to function, training and genetic set (Gollnick *et al.* 1972; Simoneau & Bouchard 1995; Kernell *et al.* 1998). The large back muscles, which are necessary for maintaining erect posture or breathing, or leg muscles, used for walking, such as the soleus muscle (SOL), are predominantly composed of slow-twitch fibres (Gupta *et al.* 1989), which allow them prolonged, steady contractions. In contrast, muscles which ensure delicate and rapid movements, e.g. muscles of the eye or muscles of the fingers, such as the extensor digitorum longus (EDL) muscles, are predominantly composed of fast-twitch fibres (Soukup *et al.* 2002).

Skeletal muscles are known to serve as the main source of amino acids in various pathological conditions, such as starvation, cancer, sepsis, or trauma providing amino acids, especially for acute-phase protein synthesis and gluconeogenesis. In severe illnesses, the enhanced amino acid release into the circulation is caused by increased proteolysis and decreased protein synthesis, resulting in muscle cachexia. A number of animal models provide evidence of the different responses of SOL and EDL to inflammation, but many of these have important limitations, particularly associated with the trigger for inflammation. Endotoxin administration is usually performed by constant infusion to prevent its rapid elimination from the body (Fish & Spitzer 1984). A high variability of response (Mela-Riker *et al.* 1988) is a disadvantage of bacteria application. Additionally, if bacteria are injected in bolus form, shock is often developed (Hau & Simmons 1977). Cecal ligation and puncture (CLP) is a complicated and invasive method requiring anaesthesia (Safranek *et al.* 2006).

It has been demonstrated that a simple and reproducible model, which causes localized inflammation (Laflamme & Rivest 1999), is subcutaneous (s.c.) turpentine administration. This agent has been used to study hormonal changes, hepatic regeneration and production of acute-phase mediators following acute inflammation (Kulkarni *et al.* 1985; Birch & Schreiber 1986; Woloski & Jamieson 1987; Okajima *et al.* 1997). To date however, little is known about effect of turpentine-induced inflammation on protein and amino acid metabolism in various types of skeletal muscle.

Considering the different fibre compositions and correspondingly different functions and metabolic features of SOL and EDL, different responses of SOL and EDL during turpentine-induced inflammation should be expected. The aim of our study was to evaluate the differences in protein and amino acid metabolism after s.c. turpentine admini-

stration in SOL (slow-twitch, red muscle) and EDL (fast-twitch, white muscle).

Methods

Animals

Male Wistar rats (body weight 40–60 g) obtained from Bio-Test (Konarovice, Czech Republic) were used in this study. The rats were housed under controlled conditions (12-h light-dark cycle, 22 °C, 55–65% relative humidity) with free access to standard laboratory chow and water. All procedures involving animals were performed according to guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University, Prague, Czech Republic.

Materials

L-[1-¹⁴C]Leucine was purchased from MP Biomedicals (Irvine, CA, USA); amino acids, cycloheximide, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, turpentine oil, LLVY-MCA and albumin from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA); hydroxide of hyamine from Packard Instruments (Meriden, CT, USA); Aminoplasmal 15 from B. Braun Medicals (Melsungen, Germany); MG-132 from Biomol (Hamburg, Germany). Other chemicals were purchased from Sigma Chemicals, Waters (Milford, MA, USA) and Lachema (Brno, Czech Republic).

Experimental design

The rats were injected by 0.2 ml of turpentine/100 g body weight in the dorsolumbar area. Control animals were injected with the same volume of 0.9% saline solution. After 24 h, the rats were anaesthetized with pentobarbital (6 mg/100 g body weight, intraperitoneally) and blood was withdrawn from the bifurcation of aorta. Administration of turpentine oil s.c. causes localized inflammation via necrosis (Wusteman *et al.* 1990). The dose of turpentine was determined on the basis of the study of Wusteman *et al.* (1990). The time interval was selected according to the experiments of Zarrabian *et al.* (1998) and Birch and Schreiber (1986) who reported the maximal levels of several acute phase proteins after 24 h following turpentine insult. SOL and EDL muscles of both legs were dissected according to Maizels *et al.* (1977). Isolated muscles were fixed to stainless steel clips to provide slight tension and immediately transferred to 2.5 ml of modified Krebs-Heinseleit bicarbonate buffer with 6 mM glucose and 2 mU/ml insulin (pH 7.4, 37 °C). Other components present in the medium were dependent on the measured parameter [protein synthesis and leucine

oxidation or proteolysis and chymotrypsin-like activity (CHTLA) of proteasome]. The medium was saturated with O₂/CO₂ (19:1). Muscles were preincubated for 30 min in a thermostatically controlled bath (37 °C) with a shaking device (70 cycles/min). After preincubation, muscles were quickly rinsed in 0.9% NaCl, blotted and transferred to a second set of vials containing fresh incubation media identical in composition and volume with the preincubation one. The viability of incubated muscles was previously confirmed in our laboratory (Safranek *et al.* 2003) as well as by other authors (Fang *et al.* 2005). Muscles from the right leg were always used for proteolysis and CHTLA determination, muscles from the left leg for protein synthesis and leucine oxidation assay.

Protein synthesis and leucine oxidation

Protein synthesis and leucine oxidation was measured after 1-h incubation of the muscle in 2.5 ml of medium enriched with amino acids in approximately physiological concentrations (Aminoplasmal 15 with added glutamine and tyrosine, total concentration 2.8 mM) and L-[1-¹⁴C]leucine (0.6 µCi/ml). At the end of the incubation period, 0.4 ml of hydroxide of hyamine was added to the well hanging above the incubation medium, the reaction was stopped by the addition of 35% (v/v) perchloric acid solution (0.2 ml) into the incubation medium and the flasks were shaken for 1 h to ensure complete absorption of ¹⁴CO₂ into the hyamine hydroxide. Muscles were removed from the incubation flasks, quickly rinsed in cold 6% (v/v) HClO₄, blotted, and homogenized in 0.6 ml of 6% (v/v) HClO₄. The homogenate was centrifuged for 5 min at 12,000 g and the pellet was used for other measurements. L-[1-¹⁴C]Leucine incorporation into precipitated proteins was estimated after their hydrolysis in 1 M NaOH. Protein synthesis and leucine oxidation was calculated using leucine specific activity in the incubation medium and expressed as nmol of incorporated leucine/g protein/h and nmol of oxidized leucine/g wet weight/h respectively. The radioactivity of the samples was measured with the liquid scintillation radioactivity counter LS 6000 (Beckman Instruments, CA, USA). The protein content of the samples was estimated according to Lowry *et al.* (1951).

Total and myofibrillar proteolysis

Total and myofibrillar protein breakdown was estimated after 2-h incubation of muscle in medium enriched with cycloheximide (0.5 mM), which prevented the reincorporation of released amino acids into proteins. As tyrosine is not

metabolized in the muscle, the amount released into the medium reflects total proteolysis in the muscle. The amount of 3-methylhistidine (3MH), a characteristic product of myofibrillar breakdown, released into the medium served for myofibrillar proteolysis calculation. The rates of amino acid release were estimated on the basis of their appropriate concentrations in the medium and weight of muscle. 3MH was quantified using a high performance liquid chromatography (HPLC) method (Waters) based on reaction with fluorecamine (Wassner *et al.* 1980; Lowell *et al.* 1986); other amino acid concentrations in the medium were determined by the HPLC method after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (Cohen & Michaud 1993; Reverter *et al.* 1997).

Chymotrypsin-like activity of proteasome

The CHTLA of proteasome was determined using fluorogenic substrate SucLLVY-MCA (0.1 mM) according to the method of Gomes-Marcondes and Tisdale (2002) with the following modifications. Muscles were homogenized after incubation and the homogenate was centrifuged for 10 min at 18,000 g at 4 °C. Cellular supernatant (0.1 ml) was incubated with substrate (0.05 mM) in a total volume of 0.2 ml, with and without inhibitor, MG-132 (0.02 mM), for 1 h on ice. Fluorescence was determined with an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 440 nm (Perkin Elmer luminescence spectrometer LS 50B). The standard curve was established for 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) which permitted the expression of CHTLA activity as nmol AMC/g protein/h. The activity was adjusted for the protein concentration of the supernatant estimated according to Lowry *et al.* (1951). The differences after subtraction of inhibited from non-inhibited activities were used for the calculations.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean ± SEM. *F*-test and two-sample *t*-test or ANOVA followed by Tukey–Kramer test (statistical software NCSS 2001; NCSS Raysville, UT, USA) were used for analysis of the data. Differences were considered significant at *P* < 0.05.

Results

Protein synthesis and leucine oxidation

Leucine oxidation was significantly higher in SOL of both intact and turpentine treated rats compared to EDL. The

Table 1 Basic parameters of protein and amino acid metabolism in EDL and SOL

	Control		Turpentine	
	EDL _c (n = 7)	SOL _c (n = 7)	EDL _t (n = 7)	SOL _t (n = 7)
Total proteolysis (nmol TYR/g wet wt/h)	109 ± 6	171 ± 7*	145 ± 5	219 ± 16 ^{†‡}
Myofibrillar proteolysis (nmol 3MH/g wet wt/h)	0.542 ± 0.033	1.167 ± 0.086*	0.845 ± 0.119	1.447 ± 0.157 [†]
CHTLA of proteasome (nmol AMC/g of protein/h)	1034 ± 71	2125 ± 125*	1640 ± 106	2436 ± 174 [†]
Leucine oxidation (nmol LEU/g wet wt/h)	45 ± 3	86 ± 7*	59 ± 9	116 ± 12 [†]
Protein synthesis (nmol LEU/g of protein/h)	2870 ± 136	3269 ± 166	1982 ± 77	2804 ± 271 [†]

SOL, the soleus muscle; EDL, the extensor digitorum longus muscle; TYR, tyrosine; 3MH, 3-methylhistidine; CHTLA, chymotrypsin-like activity; AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; LEU, leucine.

Values are expressed as mean ± SEM.

ANOVA followed by Tukey–Kramer test.

**P* < 0.05 SOL_c vs. EDL_c.

[†]*P* < 0.05 SOL_t vs. EDL_t.

[‡]*P* < 0.05 SOL_t vs. SOL_c.

difference in protein synthesis between SOL and EDL of intact animals was not significant while in SOL of turpentine treated animals, this parameter was significantly higher. There were no statistical differences between control and turpentine treated rats neither in SOL nor in EDL (Table 1). The relative decrease in protein synthesis in turpentine group against the control group was significantly higher in EDL than in SOL while leucine oxidation changes were not statistically significant (Figure 1).

Total and myofibrillar proteolysis

Total and myofibrillar proteolysis was significantly higher in SOL of both intact and turpentine treated rats compared to EDL. Application of turpentine oil caused significant

increase in total proteolysis in SOL only. Myofibrillar proteolysis in the septic group remained unchanged against control in both types of muscle (Table 1). Relative changes in total and myofibrillar proteolysis in the turpentine group against the control were not statistically significant in both SOL and EDL (Figure 1).

Chymotrypsin-like activity of proteasome

The CHTLA of proteasome was statistically higher in SOL of both intact and turpentine treated rats compared to EDL. We detected no significant changes between the control and septic groups (Table 1). However, the relative increase in CHTLA in EDL of septic rats against control was statistically higher than in SOL (Figure 1).

Amino acid release into the incubation medium

Table 2 represents rates of amino acid release from SOL and EDL of turpentine treated and control animals. Most amino acids shared a significantly greater release into the medium from SOL than from EDL in both experimental groups. In SOL of turpentine treated animals, we observed a significant decrease in leucine release compared to the control while EDL was not affected. Figure 2 demonstrates relative changes in amino acid release from EDL and SOL of turpentine treated rats against the control. In EDL, release of asparagine, leucine and BCAA (branched chain amino acid – valine, leucine, isoleucine) increased while decreasing in SOL, resulting in a significant difference. In contrast, release of glycine decreased in EDL and increased in SOL. In SOL, release of alanine decreased while release of histidine and lysine increased significantly more than in EDL.

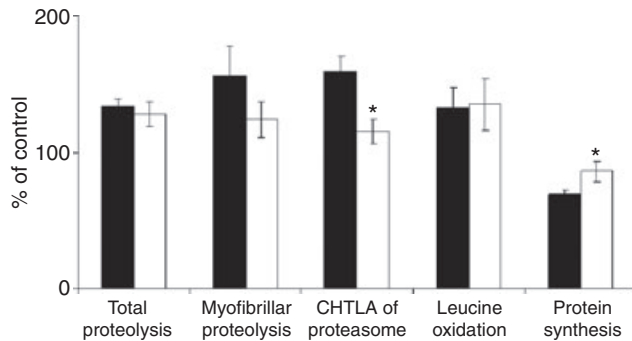


Figure 1 Relative effect of inflammation on basic parameters of protein and amino acid metabolism in EDL (filled bars) and SOL (open bars). Means of appropriate control values were used as 100%. Values are means ± SEM, *n* = 7 in each group. *F*-test followed by two-sample *t*-test; **P* < 0.05 vs. EDL. SOL, the soleus muscle; EDL, the extensor digitorum longus muscle; CHTLA, chymotrypsin-like activity.

Table 2 Release of amino acids into the medium (nmol/g wet wt/h)

	Control		Turpentine	
	EDL _c (n = 7)	SOL _c (n = 7)	EDL _t (n = 7)	SOL _t (n = 7)
ALA	739 ± 117	856 ± 108	595 ± 22	471 ± 25
ASN	105 ± 19	196 ± 27 [‡]	150 ± 11	135 ± 13
GLU	130 ± 23	330 ± 37 [‡]	143 ± 18	370 ± 36 [†]
GLN	1038 ± 139	1541 ± 218 [*]	1517 ± 72	2116 ± 176 [†]
GLY	807 ± 197	785 ± 102	712 ± 57	1063 ± 123 [†]
HIS	143 ± 13	202 ± 21	170 ± 7	282 ± 29 [†]
ILE	132 ± 20	208 ± 17 [‡]	156 ± 6	266 ± 21 [†]
LEU	261 ± 32	413 ± 32 [‡]	311 ± 11	232 ± 18 ^{†‡}
LYS	360 ± 40	417 ± 30	404 ± 29	584 ± 39 [†]
MET	73 ± 8	125 ± 10 [‡]	83 ± 12	146 ± 8 [†]
PHE	142 ± 19	222 ± 17 [‡]	167 ± 7	264 ± 20 [†]
PRO	282 ± 21	359 ± 14 [‡]	319 ± 14	457 ± 42 [†]
SER	376 ± 51	570 ± 39 [‡]	352 ± 76	740 ± 108 [†]
VAL	217 ± 30	332 ± 23 [‡]	245 ± 11	401 ± 33 [†]
BCAA	610 ± 82	953 ± 72 [‡]	712 ± 28	899 ± 72 [†]
TOTAL	4805 ± 729	6556 ± 695 [*]	5324 ± 353	7527 ± 691 [†]

SOL, the soleus muscle; EDL, the extensor digitorum longus muscle; BCAA, branched chain amino acids (valine, leucine, isoleucine); TOTAL, sum of all measured amino acids; ALA, ASN, GLU, GLN, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, SER, VAL – standard amino acid abbreviations.

Values are expressed as mean ± SEM.

ANOVA followed by Tukey–Kramer test.

^{*}P < 0.05 SOL_c vs. EDL_c.

[†]P < 0.05 SOL_t vs. EDL_t.

[‡]P < 0.05 SOL_t vs. SOL_c.

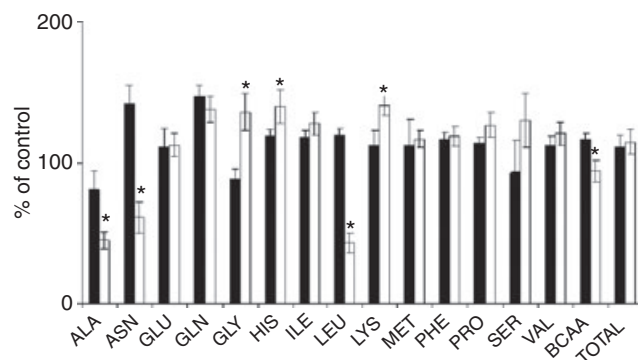


Figure 2 Relative effect of inflammation on amino acid release from EDL (filled bars) and SOL (open bars). Means of appropriate control values were used as 100%. Values are means ± SEM, n = 7 in each group. F-test followed by two-sample t-test; ^{*}P < 0.05 vs. EDL. SOL, the soleus muscle; EDL, the extensor digitorum longus muscle; BCAA, branched chain amino acids (valine, leucine, isoleucine); TOTAL, sum of all measured amino acids; ALA, ASN, GLU, GLN, GLY, HIS, ILE, LEU, LYS, MET, PHE, PRO, SER, VAL – standard amino acid abbreviations.

Discussion

We found that total proteolysis during inflammation increased comparably in SOL (28%) and EDL (34%), increase in myofibrillar proteolysis in SOL (24%) was lower than in EDL (56%). The differences in myofibrillar proteolysis could reflect the changes in CHTLA of proteasome which increased by 14% in SOL and 58% in EDL, while the total proteolysis could be influenced by other (e.g. lysosomal) mechanisms. Myofibrils cannot be cleaved by the proteasome itself (Salomon & Goldberg 1996). However, various catabolic conditions activate other proteases (e.g. caspase-3), which disintegrate myofibrils and make the actin and myosin accessible for proteasomal cleaving (Du *et al.* 2005). Our findings are in agreement with those of Hasselgren *et al.* (1989) who demonstrated that an increase in total and myofibrillar proteolysis during sepsis is significantly more pronounced in EDL than in SOL. Similar results were published by Tiao *et al.* (1997) and also after burn injury (Fang *et al.* 1998). We suggest that different response of EDL and SOL to inflammation could be caused by different sensitivities of white and red fibres to various humoral factors, e.g. hormones (Larbaud *et al.* 2001) and cytokines (Fang *et al.* 1995). In addition, glucocorticoids (Wang *et al.* 1998), proteolysis inducing factor-PIF (Lorite *et al.* 2001) and cytokines (Li *et al.* 1998) comprise some of the most potent substances which are able to affect the expression of genes of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome system.

In agreement with the enhanced catabolic activity, the release of amino acids from muscle to incubation medium during inflammation tended to increase in both SOL and EDL. Considering the important role of leucine in muscle energy and protein metabolism, the relative changes in its release are very interesting. In SOL, the release of leucine decreased while in EDL, it increased in response to turpentine treatment, resulting in a significant difference. The decrease in leucine release in SOL was observed without a corresponding increase in leucine oxidation. We hypothesize that leucine accumulates in the muscle, and/or that its intermediate – α -ketoisocaproate – is more released into the medium or transformed to β -hydroxy- β -methylbutyrate. This suggestion is partly based on an observation of increased leucine intramuscular concentration after stress hormone administration (Hammarqvist *et al.* 2001).

In our study, we observed a significant difference between the decrease in protein synthesis in EDL (31%) and SOL (14%) following turpentine treatment. Our findings are in agreement with those of Vary & Kimball (1992), who observed that the protein synthetic rate in fast-twitch muscle was reduced by sepsis, whereas slow-twitch muscles were not affected. With regard to changes in CHTLA of proteasome

in SOL and EDL during inflammation, it may be suggested that the decrease in protein synthesis is related to the changes in activity of the proteasomal system. This suggestion is based on findings that some translation initiation factors, such as eIF4G or eIF3a are cleaved in the proteasome (Baugh & Pilipenko 2004). Moreover, as the removal of leucine reduces protein synthesis through changes in both eIF2B and eIF4E (Vary *et al.* 1999) and leucine is unique among the BCAA in its ability to stimulate protein synthesis in muscle (Anthony *et al.* 2000), we suggest that possible cumulation of leucine in SOL could affect protein synthesis.

Total proteolysis increased and leucine release decreased significantly while other parameters did not change in SOL of septic rats against control. EDL remained unaffected. As reported by Chai *et al.* (2002) significant increase in muscle proteolysis following burning was connected with rise of mRNA of several proteasomal subunits. Additionally, the proteasomal complex is highly stimulated by some cytokines. Chai *et al.* (2003) detected increases in proteasomal subunit expression and enhanced TNF- α and IL-6 levels after *Escherichia coli* endotoxin administration. Finally, Bazel *et al.* (1999) found, that CLP increases IL-6 levels in liver while s.c. turpentine application does not. With regard to protein synthesis, there is no agreement considering the effect of inflammation on skeletal muscle. Kadlcikova *et al.* (2004) observed decrease in protein synthesis in skeletal muscle after CLP while Hasselgren *et al.* (1986) and Wusteman *et al.* (1990) reported no significant changes in protein synthesis in skeletal muscle during sepsis after CLP or turpentine administration respectively.

We conclude that there are differences in protein and amino acid metabolism between SOL (slow, red muscle) and EDL (fast, white muscle) both in physiological conditions and after turpentine administration. The rate of catabolic and synthetic reactions is higher in SOL than in EDL. During inflammation, CHTLA of proteasome and protein synthesis are less affected in SOL compared to EDL, as well as the rate of release of leucine and some other amino acids.

Acknowledgements

This study was funded by Research Project MSM 0021620820. We are grateful for the methodical consultation to J. Chladek, MSc, PhD, for the proof reading to C. McGrath, PhD and for the technical support to R. Rysava and H. Buzkova.

References

- Anthony J.C., Yoshizawa F., Anthony T.G., Vary T.C., Jefferson L.S., Kimball S.R. (2000) Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J. Nutr.* **130**, 2413–2419.
- Baugh J.M. & Pilipenko E.V. (2004) 20S proteasome differentially alters translation of different mRNAs via the cleavage of eIF4F and eIF3. *Mol. Cell* **16**, 575–586.
- Bazel S, Andrejko KM, Chen J, Deutschman CS. (1999) Hepatic gene expression and cytokine responses to sterile inflammation: comparison with cecal ligation and puncture sepsis in the rat. *Shock* **11**, 347–355.
- Birch H.E. & Schreiber G. (1986) Transcriptional regulation of plasma protein synthesis during inflammation. *J. Biol. Chem.* **261**, 8077–8080.
- Chai J., Wu Y., Sheng Z.Z. (2002) The relationship between skeletal muscle proteolysis and ubiquitin - proteasome proteolytic pathway in burned rats. *Burns* **28**, 527–533.
- Chai J., Wu Y., Sheng Z.Z. (2003) Role of ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle wasting in rats with endotoxemia. *Crit. Care Med.* **31**, 1802–1807.
- Cohen S.A. & Michaud D.P. (1993) Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **211**, 279–287.
- Du J., Hu Z., Mitch W.E. (2005) Molecular mechanisms activating muscle protein degradation in chronic kidney disease and other catabolic conditions. *Eur. J. Clin. Invest.* **35**, 157–163.
- Fang C.H., James H.J., Ogle C., Fischer J.E., Hasselgren P.O. (1995) Influence of burn injury on protein metabolism in different types of skeletal muscle and the role of glucocorticoids. *J. Am. Coll. Surg.* **180**, 33–42.
- Fang C.H., Li B.G., Tiao G., Wang J.J., Fischer J.E., Hasselgren P.O. (1998) The molecular regulation of protein breakdown following burn injury is different in fast- and slow-twitch skeletal muscle. *Int. J. Mol. Med.* **1**, 163–169.
- Fang C.H., Li B.G., James J.H. *et al.* (2005) Protein breakdown in muscle from burned rats is blocked by insulin-like growth factor and glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Endocrinology* **146**, 3141–3149.
- Fish R.E. & Spitzer J.A. (1984) Continuous infusion of endotoxin from an osmotic pump in the conscious unrestrained rat: a unique model of endotoxemia. *Circ. Shock* **12**, 135–149.
- Gollnick P.D., Armstrong R.B., Saubert C.W. IV, Piehl K., Saltin B. (1972) Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J. Appl. Physiol.* **33**, 312–319.
- Gomes-Marcondes M.C.C. & Tisdale M.J. (2002) Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* **180**, 69–74.
- Gupta R.C., Misulis K.E., Dettbarn W.D. (1989) Activity dependent characteristics of fast and slow muscle:

- biochemical and histochemical considerations. *Neurochem. Res.* **14**, 647–655.
- Hammarqvist F., Ejesson B., Wernerman J. (2001) Stress hormones initiate prolonged changes in the muscle amino acid pattern. *Clin. Physiol.* **21**, 44–50.
- Hasselgren P.O., Talamini M., James J.H., Fischer J.E. (1986) Protein metabolism in different types of skeletal muscle during early and late sepsis in rats. *Arch. Surg.* **121**, 918–923.
- Hasselgren P.O., James J.H., Benson D.W. et al. (1989) Total and myofibrillar protein breakdown in different types of rat skeletal muscle: effects of sepsis and regulation by insulin. *Metabolism* **38**, 634–640.
- Hau T. & Simmons R.L. (1977) Animal models of peritonitis. *Surg. Gynecol. Obstet.* **144**, 755–756.
- Kadlcikova J., Holecek M., Safranek R., Tilser I., Kessler B.M. (2004) Effects of proteasome inhibitors MG132, ZL3VS and AdaAhx3L3VS on protein metabolism in septic rats. *Int. J. Exp. Pathol.* **85**, 365–371.
- Kernell D., Hensbergen E., Lind A., Eerbeek O. (1998) Relation between fibre composition and daily duration of spontaneous activity in ankle muscles of the cat. *Arch. Ital. Biol.* **136**, 191–203.
- Kulkarni A.B., Reinke R., Feigelson P. (1985) Acute phase mediators and glucocorticoids elevate α 1-acid glycoprotein gene transcription. *J. Biol. Chem.* **260**, 15386–15389.
- Laflamme N. & Rivest S. (1999) Effects of systemic immunogenic insults and circulating proinflammatory cytokines on the transcription of the inhibitory factor kappaB alpha within specific cellular populations of the rat brain. *J. Neurochem.* **73**, 309–321.
- Larbaud D., Balage M., Taillandier D., Combaret L., Grizard J., Attaix D. (2001) Differential regulation of the lysosomal, Ca²⁺-dependent and ubiquitin/proteasome-dependent proteolytic pathways in fast-twitch and slow-twitch rat muscle following hyperinsulinaemia. *Clin. Sci.* **101**, 551–558.
- Li Y.-P., Schwartz R.J., Waddell I.D., Holloway B.R., Reid M.B. (1998) Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumour necrosis factor alpha. *FASEB J.* **12**, 871–880.
- Lorite M.J., Smith H.J., Arnold J.A., Morris A., Thompson M.G., Tisdale M.J. (2001) Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). *Br. J. Cancer* **85**, 297–302.
- Lowell B.B., Ruderman N.B., Goodman M.N. (1986) Regulation of myofibrillar protein degradation in rat skeletal muscle during brief and prolonged starvation. *Metabolism* **35**, 1121–1127.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Maizels E.Z., Ruderman N.B., Goodman M.N., Lau D. (1977) Effect of acetoacetate on glucose metabolism in the soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat. *Biochem. J.* **162**, 557–568.
- Mela-Riker L., Alexander P., Bartos D. et al. (1988) Chronic hyperdynamic sepsis in the rat: I. Characterization of the animal model. *Circ. Shock* **25**, 231–244.
- Okajima A., Miyazawa K., Naitoh Y., Inoue K., Kitamura N. (1997) Induction of hepatocyte growth factor activator messenger RNA in the liver following tissue injury and acute inflammation. *Hepatology* **25**, 97–102.
- Reverter M., Lundh T., Lindberg J.A. (1997) Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **696**, 1–8.
- Rivero J.L., Talmadge R.J., Edgerton V.R. (1996) Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training. *Anat. Rec.* **246**, 195–207.
- Rivero J.L., Talmadge R.J., Edgerton V.R. (1998) Fibre size and metabolic properties of myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **19**, 733–742.
- Safranek R., Holecek M., Kadlcikova J. et al. (2003) Effect of acute acidosis on protein and amino acid metabolism in rats. *Clin. Nutr.* **22**, 437–443.
- Safranek R., Holecek M., Sispera L., Muthny T. (2006) Aspects of protein and amino acid metabolism in a model of severe glutamine deficiency in sepsis. *Ann. Nutr. Metab.* **50**, 361–367.
- Salomon V. & Goldberg A.L. (1996) Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J. Biol. Chem.* **271**, 26690–26697.
- Sant'ana Pereira J.A., Wessels A., Nijtmans L., Moorman A.F., Sargeant A.J. (1995) New method for the accurate characterization of single human skeletal muscle fibres demonstrates a relation between mATPase and MyHC expression in pure and hybrid fibre types. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**, 21–34.
- Schiaffino S. & Reggiani C. (1996) Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* **76**, 371–423.
- Simoneau J.A. & Bouchard C. (1995) Genetic determinism of fiber type proportion in human skeletal muscle. *FASEB J.* **9**, 1091–1095.
- Soukup T., Zacharova G., Smerdu V. (2002) Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem.* **104**, 399–405.
- Tiao G., Lieberman M., Fischer J.E., Hasselgren P.O. (1997) Intracellular regulation of protein degradation during sepsis is

- different in fast- and slow-twitch muscle. *Am. J. Physiol.* 272(3 Pt 2), R849–R856.
- Vary T.C. & Kimball S.R. (1992) Sepsis-induced changes in protein synthesis: differential effects on fast- and slow-twitch muscles. *Am. J. Physiol.* 262(6 Pt 1), C1513–C1519.
- Vary T.C., Jefferson L.S., Kimball S.R. (1999) Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 277(6 Pt 1), E1077–E1086.
- Wang L., Lus G.-J., Wang J.J., Hasselgren P.O. (1998) Dexamethasone stimulates proteasome- and calcium-dependent proteolysis in cultured L6 myotubes. *Shock* 10, 298–306.
- Wassner S.J., Schlitzer L., Li J.B. (1980) A rapid, sensitive method for the determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 104, 284–289.
- Woloski B.M.R.N.J. & Jamieson J.C. (1987) Rat corticotrophin, insulin and thyroid hormone levels during the acute phase response to inflammation. *Comp. Biochem. Physiol.* 86, 15–19.
- Wusteman M., Wight D.G., Elia M. (1990) Protein metabolism after injury with turpentine: a rat model for clinical trauma. *Am. J. Physiol.* 259(6 Pt 1), E763–E769.
- Zarrabian S., Attaix D., Marcy J. *et al.* (1998) Effects of alimentary whole proteins versus their small peptide hydrolysates on liver and skeletal muscle during the acute inflammation phase in the rat. *Clin. Nutr.* 17, 169–176.

10.2.1.3 Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L: Proteasome inhibitor MG-132 enhances whole-body protein turnover in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(1):38-42

Proteasome inhibitor MG-132 enhances whole-body protein turnover in rat

Milan Holecek^{a,*}, Tomas Muthny^c, Miroslav Kovarik^a, Ludek Sispera^b

^a Department of Physiology, Charles University, Medical Faculty, Hradec Kralove, Czech Republic

^b Department of Biochemistry, Charles University, Medical Faculty, Hradec Kralove, Czech Republic

^c Department of Pharmacology and Toxicology, Charles University, Pharmaceutical Faculty, Hradec Kralove, Czech Republic

Received 7 April 2006

Available online 25 April 2006

Abstract

Proteasome inhibitors are novel therapeutic agents which may be used in treatment of cancer and other severe disorders. We studied the effect of proteasome inhibitor MG-132 on protein and amino acid metabolism. In MG-132-treated rats we observed a significant decrease in proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle and an increase in whole-body protein turnover (i.e., increase in whole-body proteolysis and protein synthesis). Proteasome-dependent proteolysis was activated in the liver and kidney, protein synthesis increased in skeletal muscle, liver, and kidney. Insignificant changes were found in jejunum and colon. MG-132 administration induced a significant increase in concentration of several amino acids in blood plasma and their decrease in jejunum and colon. We conclude that administration of MG-132 affects both protein anabolic and protein catabolic pathways via the direct effect on proteasome-dependent proteolysis and indirect effect on proteolysis and protein synthesis via unidentified mediators.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Proteasome; Inhibitor; Protein metabolism; Ubiquitin; Nutrition; Amino acids

Ubiquitin-proteasome pathway is a well-recognized system localized in cytosol and nucleus responsible for degradation of short-lived and abnormal proteins, e.g., proteins related to signal transduction, regulation of the mitotic cycle, antigen presentation, and apoptosis [1]. The involvement of ubiquitin-proteasome system in these events was a powerful stimulus for development of a large spectrum of proteasome inhibitors with different structure and proteasome specificity and their introduction as novel therapeutic agents, particularly for treatment of certain types of cancer, and inflammatory disorders [2]. The first drug of this class is bortezomib, which has been approved for treatment of multiple myeloma [3].

It was demonstrated that ubiquitin-proteasome system also plays an important role in mediating the degradation of long-lived myofibrillar proteins in skeletal muscle and that activation of the proteasome system is the main cause

of the accelerated breakdown of skeletal protein in sepsis [4–7]. Consequently, it was hypothesized that targeting specific molecular mechanisms of muscle proteolysis by proteasome inhibitors may inhibit development of muscle wasting in proteocatabolic illness. The hypothesis was confirmed by observation of inhibitory effect of proteasome inhibitors on proteolysis in experiments using skeletal muscles isolated from rats in catabolic states including sepsis, burn injury, cancer, uremia, denervation, and hyperthyroidism [8–12]. In all these *in vitro* studies, the incubated muscles were treated by proteasome inhibitor. We found only one study in which the inhibitory effect of proteasome inhibitor on muscle proteolysis was demonstrated after *in vivo* administration [13].

Studies evaluating the effect of *in vivo* administration of proteasome inhibitors are necessary because of their potential use in clinical practice, where their effect on protein metabolism should be considered as an important side effect which may be utilized in treatment of muscle wasting

* Corresponding author. Fax: +420 495816335.

E-mail address: holecck@lfhk.cuni.cz (M. Holecek).

disorders. However, there is no information about the effect of proteasome inhibitors on whole-body protein turnover, particularly on changes in protein breakdown and protein synthesis in specific tissues which could significantly affect protein balance and the outcome of the illness.

The aim of the present study was to evaluate the effect of proteasome inhibitor MG-132 on parameters of protein metabolism of healthy laboratory rat under *in vivo* conditions. MG-132 belongs to the group of peptide aldehydes, it is a strong inhibitor of proteasome and also partly inhibits calpains, caspases and cathepsins [2]. Calpains and caspases are believed to play a role in disassembly of sarcomeric proteins, an initial step in degradation of myofibrillar proteins of skeletal muscle [14,15]. Cathepsins do not contribute significantly to overall protein breakdown in skeletal muscle [4].

Materials and methods

Animals and materials. Male Wistar rats (BioTest, Konarovice, CR) weighing about 200 g were housed in standardized cages in quarters with controlled temperature and a 12-h light–dark cycle and received Velaz-Altromin 1320 laboratory chow and drinking water *ad libitum*. All procedures involving animals were performed according to guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University.

L-[1-¹⁴C]leucine was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK), [¹⁴C]bicarbonate was from Du Pont-NEN (Bad Homburg, Germany), carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG132) from Biomol (Plymouth Meeting, PA) and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate from Waters (Milford, MA). Leucine, Folin-Ciocalteu phenol reagent, dimethyl sulfoxide, and albumin were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). The remaining chemicals were obtained from Lachema (Brno, CZ).

Experimental design. Two separate studies were performed. In the first study, rats starved 24 h and then were injected intraperitoneally with MG-132 dissolved in dimethylsulfoxide at a dose of 10 mg/kg b.w. The dose of MG-132 was determined on the basis of our *in vitro* studies [11] and experiments evaluating the effect of different doses of various proteasome inhibitors on aminoacidemia (unpublished). Control animals received a corresponding volume of the solvent. Five hours later, the animals were sacrificed in ether narcosis by exsanguination via the abdominal aorta. Afterwards the gastrocnemius muscle, liver, kidney, and samples of jejunum and colon were quickly removed and frozen in liquid nitrogen for measurement of chymotrypsin-like activity. Concentrations of glucose, lipids, ALT, AST, urea, and zinc were estimated in blood plasma.

The experiments of the second study were performed separately. A polyethylene cannula was inserted into the jugular vein and the rat fasted for 24 h. The next day, the animal was injected intraperitoneally with MG-132 or solvent and placed in a glass metabolic cage. Two hours later, unrestrained and conscious rat was infused with L-[1-¹⁴C]leucine (1.9 μ Ci/ml). A priming dose of 0.7 ml infused within 4 min 35 s was followed by a constant infusion at a rate of 0.40 ml/h for 210 min. The dose of labelled leucine and the rate of infusion were estimated on the basis of our previous studies [16]. The rat was killed by exsanguination via the abdominal aorta during 215th min from the beginning of the infusion. Afterwards the liver, gastrocnemius muscle, kidney, and samples of jejunum and colon were quickly removed and immediately frozen in liquid nitrogen for measurement of protein synthesis.

The parameters of whole body leucine metabolism were evaluated at steady-state conditions by the procedure described in detail previously [16]. The expired CO₂ was trapped at 10-min intervals between the 125th and 185th min of infusion by monoethanolamine. The average value of six measurements of ¹⁴CO₂ radioactivity in expired air at steady-state

condition was used for calculations of the leucine oxidation rate. The ¹⁴CO₂ recovery factor (FR) estimated by infusion of [¹⁴C]bicarbonate was about 90% both for MG-132 and solvent treated animals. Leucine specific activity (SA_{Leu}), turnover (Q_{Leu}), clearance (C_{Leu}), and decarboxylation (D_{Leu}) rates were calculated using the following formulae:

$$SA_{Leu} \text{ (dpm}/\mu\text{mol}) = \frac{\text{Leu radioactivity (dpm/ml)}}{\text{Leu concentration } (\mu\text{mol/ml})}$$

$$Q_{Leu} \text{ } (\mu\text{mol/h}) = \frac{\text{infusion rate (dpm/h)}}{SA_{Leu} \text{ in plasma (dpm}/\mu\text{mol})}$$

$$C_{Leu} \text{ (ml/h)} = \frac{Q_{Leu} \text{ } (\mu\text{mol/h})}{\text{plasma Leu } (\mu\text{mol/ml})}$$

$$D_{Leu} \text{ } (\mu\text{mol/h}) = \frac{{}^{14}\text{CO}_2 \text{ production rate (dpm/h)}}{SA_{Leu} \text{ in plasma (dpm}/\mu\text{mol}) \cdot \text{FR}}$$

Whole body leucine metabolism was considered to take place within a common metabolic pool represented by free plasma leucine. Due to the fact that exogenous leucine intake (*E*) was zero in our protocol, Q_{Leu} estimates the leucine released from protein, i.e., the protein breakdown (*B*) as described by the equation: $Q = \text{In} + D = B + E$. By using this formula, rates of protein incorporation into protein (In), the oxidized fraction of leucine ($\text{OF} = D \times 100/Q$) and protein balance ($\text{PB} = \text{In} - B = E - D$) were calculated. Therefore, the absolute values of leucine oxidation and protein balance are of the same value in our experimental conditions.

Measurement of protein synthesis. For the assessment of leucine incorporation into protein, small pieces of tissue (about 0.5 g) were rinsed and homogenized in 2% (v/v) perchloric acid. The precipitated proteins were collected by centrifugation. The supernatant was used for measurement of L-[1-¹⁴C]leucine radioactivity and leucine concentration. To avoid contamination by ketoisocaproate, samples were treated with 30% hydrogen peroxide, which causes the carboxyl carbon of ketoisocaproate to be released as CO₂. The pellet was washed three times and then hydrolyzed in 2 N NaOH. Aliquots were taken for protein content [17] and radioactivity measurement. The fractional protein synthesis rates were calculated using the equation derived by Garlick et al. [18]:

$$\frac{Sb}{Si} = \frac{\lambda_i}{(\lambda_i - K_s)} \times \frac{(1 - e^{-K_s t})}{1 - e^{-\lambda_i t}} - \frac{K_s}{(\lambda_i - K_s)}$$

where Sb and Si are the specific activities of the protein-bound and free acid-soluble tissue leucine pools, respectively, in disintegrations per minute per micromole; λ_i is the rate constant for the rate of rise of specific activity of leucine in the acid-soluble amino acid pool per day; *t* is the duration of L-[1-¹⁴C]leucine infusion in days, and *K_s* is the fraction of protein mass renewed each day, in percent per day.

Measurement of chymotrypsin-like activity. The chymotrypsin-like activity of the proteasome was determined using the fluorogenic substrate Suc LLYV-MCA (0.1 mM) according to the method of Gomes-Marcondes et al. [19]. Muscles were homogenized in medium containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂, and 1 mM dithiothreitol. The homogenate was then centrifuged for 10 min at 18,000g at 4 °C. Cellular supernatant (0.1 ml) was incubated with substrate (0.05 mM) in a total volume of 0.2 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), with or without inhibitor, MG-132 (0.02 mM), for 1 h on ice. The reaction was terminated by addition of 80 mM sodium acetate, pH 4.3 (1 ml). The fluorescence was determined using an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 440 nm (Perkin Elmer luminescence spectrometer LS 50 B). Standard curve was established for 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), which permitted the expression of CHTLA activity as nmol AMC/g protein/h. The activity was adjusted for protein concentration of the sample. Only the MG-132-inhibited activity was used for the calculations.

Other techniques. Amino acid concentrations in deproteinized samples of blood plasma or tissues were determined with high-performance liquid chromatography (Waters, Milford, MA) after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Plasma levels of ALT, AST, glucose, triglycerides, and cholesterol were measured using commercial tests (Boehringer, Mannheim, Germany; EliTech, Sées, France, and Lachema, Brno, CZ). Zn²⁺ was determined using ion-selective

electrode on AVL 983-S (Block Scientific, Englewood, NJ). The radioactivity of the samples was measured with the liquid scintillation radioactivity counter LS 6000 (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm SE. Statistical analysis was performed using *F* test and unpaired Student's *t* test. A difference was considered significant at $P < 0.05$. Statistical software NCSS 2001 (NCSS, Kaysville, Utah) was used for the analysis.

Results

MG-132 treatment induced a significant increase in glycemia and a marked decrease in zinc concentration in blood plasma. There were no differences in plasma concentration of lipids, ALT, AST, and urea (Table 1). A significant decrease in chymotrypsin-like activity (indicating the rate of proteasome-dependent proteolysis in our study) was found in skeletal muscle while an increase was observed in the liver and kidney. The changes in jejunum and colon were insignificant (Fig. 1).

There was a significant increase in whole-body protein synthesis and proteolysis in MG-132-treated animals. However, the effect on protein balance, leucine oxidation, and leucine oxidized fraction was insignificant (Table 2). A significant increase in protein synthesis was observed in skeletal muscle, liver, and kidney (Fig. 2).

Table 3 demonstrates that MG-132 treatment induced a marked increase in amino acid concentrations in blood plasma while changes in skeletal muscle were insignificant. Moderate effect of MG-132 was found in liver (an increase in citrulline) and kidney (a decrease in proline). Significant changes resulting in decrease in total amino acid concentration after MG-132 treatment were found in jejunum and colon. In both tissues decreased asparagine, glycine, citrulline, alanine, tyrosine, valine, methionine, and isoleucine.

Discussion

MG-132 is a strong inhibitor of proteasome and its effect should be expected particularly in tissues where there

Table 1
Parameters of control and experimental animals (Study 1)

	Control ($n = 9$)	MG-132 ($n = 9$)
Body weight (g)	212 \pm 2	212 \pm 2
Blood plasma		
Glucose (mmol/l)	4.28 \pm 0.22	6.40 \pm 0.45*
Triglycerides (mmol/l)	0.45 \pm 0.06	0.31 \pm 0.07
Cholesterol (mmol/l)	1.79 \pm 0.07	1.68 \pm 0.09
HDL cholesterol (mmol/l)	1.28 \pm 0.05	1.21 \pm 0.06
LDL cholesterol (mmol/l)	0.30 \pm 0.03	0.33 \pm 1.52
Urea (mmol/l)	4.07 \pm 0.27	4.12 \pm 0.21
ALT (μ mol/l)	0.87 \pm 0.08	0.83 \pm 0.06
AST (μ mol/l)	2.30 \pm 0.14	2.11 \pm 0.14
Zinc (μ mol/l)	31.99 \pm 1.97	20.86 \pm 0.72*

Values are means \pm SE. *F* test and unpaired Student's *t* test.

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

* $P < 0.05$.

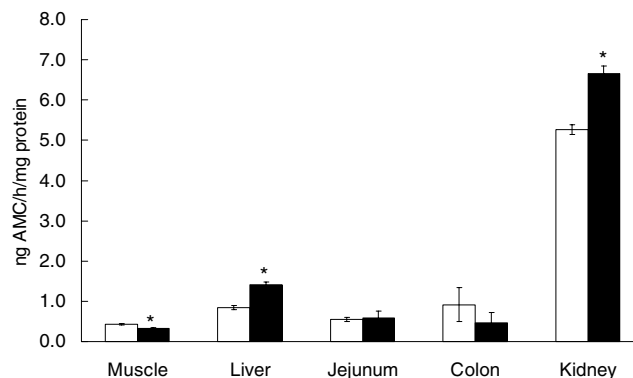


Fig. 1. Chymotrypsin-like activity in proteasome in specific tissues in control (open bars) and MG-132-treated rats (filled bars). Values are means \pm SE with $n = 9$ in each group. *F* test and unpaired Student's *t* test, * $P < 0.05$ (Study 1).

Table 2
Effect of MG-132 on whole-body protein and leucine metabolism (Study 2)

	Control ($n = 8$)	MG-132 ($n = 8$)
Body weight (g)	204 \pm 3	212 \pm 3
Proteolysis (μ mol Leu $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	171 \pm 12	232 \pm 24*
Protein synthesis (μ mol Leu $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	147 \pm 11	199 \pm 20*
Protein balance (μ mol Leu $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	-24.1 \pm 2.8	-32.1 \pm 3.9
Leucine oxidation (μ mol Leu $\text{kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	24.1 \pm 2.8	32.1 \pm 3.9
Leucine oxidized fraction (%)	14.1 \pm 1.3	13.9 \pm 0.8
Leucine clearance ($\text{ml kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	1198 \pm 65	1338 \pm 89

Values are means \pm SE. *F* test and unpaired Student's *t* test.

* $P < 0.05$.

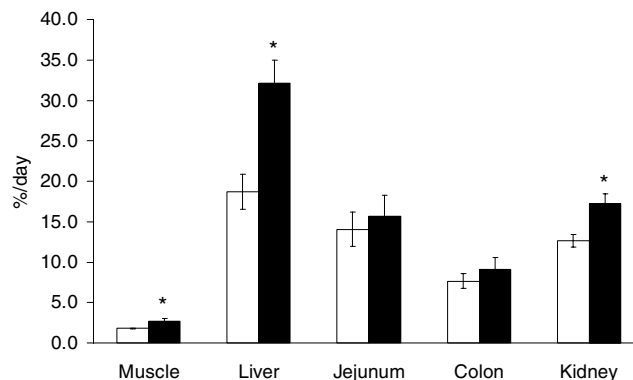


Fig. 2. Fractional rate of protein synthesis in specific tissues in control (open bars) and MG-132-treated rats (filled bars). Values are means \pm SE with $n = 8$ in each group. *F* test and unpaired Student's *t* test, * $P < 0.05$ (Study 2).

are few lysosomes and proteasome-dependent proteolysis is the major proteolytic pathway. Such a tissue is skeletal muscle [20] which is the most abundant tissue in the body, accounting approximately 50% of the total body mass. For those reasons, and because the decrease in protein breakdown in skeletal muscle after treatment by proteasome inhibitors has been demonstrated in a number of studies (see introduction), a significant decrease in whole-body proteolysis has been expected after MG-132 treatment.

Table 3
Effect of MG-132 on amino acid concentrations in blood plasma and muscle (Study 2)

	Blood plasma ($\mu\text{mol/l}$)		Skeletal muscle (nmol/g wet tissue)	
	Control ($n = 8$)	MG-132 ($n = 8$)	Control ($n = 8$)	MG-132 ($n = 8$)
Aspartate	5 \pm 1	8 \pm 1*	1132 \pm 144	1297 \pm 194
Glutamate	217 \pm 20	255 \pm 17	4485 \pm 611	3755 \pm 568
Serine	166 \pm 11	218 \pm 18*	1124 \pm 109	1106 \pm 145
Asparagine	41 \pm 4	55 \pm 3*	366 \pm 40	326 \pm 39
Glycine	237 \pm 27	290 \pm 21	1,595 \pm 178	1,342 \pm 179
Glutamine	336 \pm 33	449 \pm 28*	4,577 \pm 451	4,389 \pm 586
Histidine	45 \pm 5	61 \pm 4*	307 \pm 54	300 \pm 49
Arginine	51 \pm 6	75 \pm 5*	— ^a	— ^a
Citrulline	24 \pm 3	36 \pm 3*	184 \pm 23	200 \pm 28
Threonine	79 \pm 9	105 \pm 6*	306 \pm 35	287 \pm 39
Alanine	203 \pm 18	300 \pm 24*	958 \pm 83	1134 \pm 157
Proline	86 \pm 7	114 \pm 10*	697 \pm 82	679 \pm 85
Tyrosine	41 \pm 5	45 \pm 4	77 \pm 7	64 \pm 7
Valine	168 \pm 12	202 \pm 18	181 \pm 16	176 \pm 20
Methionine	33 \pm 3	45 \pm 3*	27 \pm 2	22 \pm 4
Isoleucine	84 \pm 6	106 \pm 9	93 \pm 8	84 \pm 8
Leucine	144 \pm 10	175 \pm 16	149 \pm 14	143 \pm 17
Lysine	285 \pm 23	368 \pm 26*	527 \pm 59	476 \pm 45
Phenylalanine	45 \pm 4	65 \pm 5*	72 \pm 8	75 \pm 10
Total AA	2291 \pm 184	2972 \pm 163*	16,856 \pm 1,570	15,855 \pm 1,966

Means \pm SE. *F* test and unpaired Student's *t* test.

^a Arginine was not estimated because of interference with high levels of carnosine.

* $P < 0.05$.

However, despite proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle decreased, an increase in whole-body protein turnover was observed in MG-132-injected animals. Proteolysis increased in liver and kidney, protein synthesis increased in liver, kidney, and muscle.

The discrepancy between our expectations and findings could be explained by effect of proteasome inhibitors on expression, activation or inhibition of various humoral factors, mediators, transcription factors, etc. which could affect protein synthesis and proteolysis. Here are examples:

- proteasome inhibition by MG-132 effectively blocks glucocorticoid receptor down-regulation [21];
- cultured endothelial cells treated with MG-132 increased expression of interleukine II-6, a cytokine that plays an important role in inflammatory injury [22];
- proteasome inhibition in hepatocytes induces production of massive quantities of the proinflammatory interleukine II-8, possibly resulting in neutrophil infiltration and liver injury [23];
- proteasome inhibition leads to activation of heat shock factors [24];
- in certain cells, proteasome inhibitors may induce activation of NF- κ B through increase in inhibitory κ B kinase activation [25].

Some of these changes (i.e., production of proinflammatory cytokines, activation of NF- κ B, etc.) are considered as the typical features of systemic inflammatory response in proteocatabolic illness, e.g., sepsis and burn injury. The argument supporting the speculation may be an observa-

tion of decreased concentration of zinc, which is a typical finding associated with increased production of proinflammatory cytokines [26].

It should be noted that the response of the body to administration of proteasome inhibitor may differ in healthy state and in stress illness. In a recent study, Cuschieri et al. [27] demonstrated that proteasome inhibition by MG-132 affects lipopolysaccharide-induced signaling in macrophages and results in a conversion to an anti-inflammatory phenotype. The authors observed decreased degradation of I κ B resulting in abolished NF- κ B activation, and increased IL-10 and decreased IL-8 and TNF- α production.

Although moderate or insignificant changes in amino acid concentrations were observed in skeletal muscle, liver, and kidney, a marked effect of MG-132 was found in blood plasma, jejunum, and colon. The increase in plasma amino acid concentrations may be related to higher increase in whole-body proteolysis in comparison with increase in whole-body protein synthesis or impaired transport of amino acids across the cell membrane. These suggestions are in agreement with higher negativity of protein balance ($P = 0.1185$) in MG-132-treated animals and with decreased concentration of several amino acids in jejunum and colon.

It seems practically important that after MG 132 administration, proteolysis is inhibited and protein synthesis is activated in skeletal muscle, which may result in a marked increase in muscle protein content. As in incubated skeletal muscle an inhibition of protein synthesis was observed when MG-132 was added into incubation medium [11], we assume that the activation of protein synthesis is caused rather by action of some humoral factors than by

the direct influence of MG-132 on protein synthesis. The observation of inhibitory effect of MG-132 on protein synthesis under in vitro conditions in our recent study and increased protein synthesis in skeletal muscle under in vivo conditions in the present one indicate that the observations in vitro may not necessarily reflect the in vivo situation and caution must be exercised in interpreting data obtained from in vitro experiments.

In conclusion, the main effect of MG-132 administration on protein metabolism seems to be the inhibition of proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle and the increase in protein turnover associated with a significant increase in proteasome-dependent proteolysis in the liver and kidney, and protein synthesis in the liver, kidney, and skeletal muscle. These changes are caused by the direct influence of proteasome inhibitor on proteasome-dependent proteolysis and by influence of various factors, activity of which was modified by MG-132 treatment.

Acknowledgments

This study was supported by Research Project MSM0021620820 and by the Grant 303/03/1512 of the Grant Agency of the Czech Republic. We are grateful for technical support of I. Altmannova, H. Buzkova, L. Kriesfalusyova, D. Jezková, and R. Rysava. Many thanks to Dr. Hana Skalska for help with statistical analysis and to Jan Tilser for proofreading of the English grammar.

References

- [1] M.H. Glickman, A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 373–428.
- [2] A.F. Kisselev, A.L. Goldberg, Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chem. Biol.* 8 (2001) 739–758.
- [3] P.G. Richardson, T. Hideshima, K.C. Anderson, Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers, *Cancer Control* 10 (2003) 361–369.
- [4] G. Tiao, J.M. Fagan, N. Samuels, J.H. James, H. Hudson, M. Lieberman, J.E. Fischer, P.O. Hasselgren, Sepsis stimulates non-lysosomal, energy-dependent proteolysis and increases ubiquitin mRNA levels in rat skeletal muscle, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 2255–2264.
- [5] D. Fischer, X. Sun, G. Gang, T. Pritts, P.O. Hasselgren, The gene expression of ubiquitin ligase E3 α is upregulated in skeletal muscle during sepsis in rats. Potential role of glucocorticoids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267 (2000) 504–508.
- [6] D. Attaix, S. Ventadour, A. Codran, D. Bechet, D. Taillandier, L. Combaret, The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting, *Essays Biochem.* 41 (2005) 173–186.
- [7] M.J. Tisdale, The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting, *J. Support. Oncol.* 3 (2005) 209–217.
- [8] N.E. Tawa, R. Odessey, A.L. Goldberg, Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 197–203.
- [9] S.C. Hobler, G. Tiao, J.E. Fischer, J. Monaco, P.O. Hasselgren, Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) R30–R37.
- [10] C.H. Fang, B.G. Li, G. Tiao, J.J. Wang, J.E. Fischer, P.O. Hasselgren, The molecular regulation of protein breakdown following burn injury is different in fast- and slow-twitch skeletal muscle, *Int. J. Mol. Med.* 1 (1998) 163–169.
- [11] J. Kadlcikova, M. Holecek, R. Safranek, I. Tilser, B.M. Kessler, Effects of proteasome inhibitors MG132, ZL₃VS and AdaAhx₃L₃VS on protein metabolism in septic rats, *Int. J. Exp. Pathol.* 85 (2004) 365–371.
- [12] J. Kadlcikova, M. Holecek, R. Safranek, I. Tilser, Direct effects of proteasome inhibitor AdaAhx₃L₃VS on protein and amino acid metabolism in rat skeletal muscle, *Physiol. Res.* 54 (2005) 541–547.
- [13] D. Fischer, G. Gang, T. Pritts, P.O. Hasselgren, Sepsis-induced muscle proteolysis is prevented by a proteasome inhibitor in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 (2000) 215–221.
- [14] J. Huang, N.E. Forsberg, Role of calpain in skeletal muscle protein degradation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 12100–12105.
- [15] J. Du, X. Wang, C. Miereles, J.L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S.R. Price, W.E. Mitch, Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 115–123.
- [16] M. Holecek, L. Sprongl, F. Skopec, C. Andrys, M. Pecka, Leucine metabolism in TNF- α - and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) E1052–E1058.
- [17] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [18] P.K. Garlick, D.J. Millward, W.P.T. James, The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats, *Biochem. J.* 136 (1973) 935–945.
- [19] M.C.C. Gomes-Marcondes, M.J. Tisdale, Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress, *Cancer Lett.* 180 (2002) 69–74.
- [20] D. Bechet, A. Tassa, D. Taillandier, L. Combaret, D. Attaix, Lysosomal proteolysis in skeletal muscle, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 2098–2114.
- [21] A.D. Wallace, J.A. Cidlowski, Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signalling by glucocorticoids, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42714–42721.
- [22] T. Shibata, T. Imaizumi, W. Tamo, T. Matsumiya, M. Kumagai, X.F. Cui, H. Yoshida, S. Takaya, I. Fukuda, K. Satoh, Proteasome inhibitor MG-132 enhances the expression of interleukin-6 in human umbilical vein endothelial cells: involvement of MAP/ERK kinase, *Immunol. Cell Biol.* 80 (2002) 226–230.
- [23] S. Joshi-Barve, S.S. Barve, W. Butt, J. Klein, C.J. McClain, Inhibition of proteasome function leads to NF-kappaB-independent Il-8 expression in human hepatocytes, *Hepatology* 38 (2003) 1178–1187.
- [24] Y. Kawazoe, A. Nakai, M. Tanabe, K. Nagata, Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family, *Eur. J. Biochem.* 255 (1998) 356–362.
- [25] Z.H. Nemeth, H.R. Wong, K. Odoms, E.A. Deitch, C. Szabo, E.S. Vizi, G. Hasko, Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 342–349.
- [26] N.E. Krebs, K.M. Hambidge, Zinc metabolism and homeostasis: the application of tracer techniques to human zinc physiology, *Biometals* 14 (2001) 397–412.
- [27] J. Cuschieri, D. Gourlay, I. Garcia, S. Jelacic, R.V. Maier, Implications of proteasome inhibition: an enhanced macrophage phenotype, *Cell Immunol.* 227 (2004) 140–147.

10.2.1.4 Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L: Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues. *Food Chem Toxicol* 2009;47(1):255-9



Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on protein metabolism in whole body and in selected tissues

M. Holecek*, T. Muthny, M. Kovarik, L. Sispera

Department of Physiology and Biochemistry, Charles University, Medical Faculty, Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2008

Accepted 11 November 2008

Keywords:

Leucine

Amino acids

Protein synthesis

Proteolysis

ABSTRACT

Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) is a leucine metabolite with protein anabolic effect. The aim of the study was to examine the role of exogenous HMB on leucine and protein metabolism in whole body and selected tissues.

Rats were administered by HMB (0.1 g/kg b.w.) or by saline. The parameters of whole-body protein metabolism were evaluated 24 h later using L-[1-¹⁴C]leucine and L-[3,4,5-³H]phenylalanine. Changes in proteasome dependent proteolysis and protein synthesis were determined according the “chymotrypsin-like” enzyme activity and labeled leucine and phenylalanine incorporation into the protein.

A decrease in leucine clearance and whole-body protein turnover (i.e., a decrease in whole-body proteolysis and protein synthesis) was observed in HMB treated rats. Proteasome-dependent proteolysis decreased significantly in skeletal muscle, changes in heart, liver, jejunum, colon, kidney, and spleen were insignificant. Decrease in protein synthesis was observed in the heart, colon, kidney, and spleen, while an increase was observed in the liver. There were no significant changes in leucine oxidation.

We conclude that protein anabolic effect of HMB in skeletal muscle is related to inhibition of proteolysis in proteasome. Alterations in protein synthesis in visceral tissues may affect several important functions and the metabolic status of the whole body.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) is a leucine metabolite (Fig. 1) with protein anabolic effect which may be employed in treatment of proteocatabolic illness or to increase muscle mass and/or muscle strength during exercise. A favorable effect of exogenous HMB on protein balance has been reported in cancer (May et al., 2002; Smith et al., 2005) and in resistance exercise (Jówko et al., 2001; Nissen and Sharp, 2003). Unfortunately, the results of controlled trials evaluating the effect of HMB alone or in mixture with other dietary supplements in reversing cachexia in proteocatabolic illness are not conclusive (May et al., 2002; Marcora et al., 2005; Clark et al., 2000) and further studies are necessary to confirm beneficial effect of HMB.

The most of the available data concerning the effect of HMB is related to skeletal muscle and there is the absence of relevant information about changes in whole-body protein metabolism and in specific tissues which could significantly affect protein balance and outcome of the illness.

It seems, that HMB is responsible partly for well-known protein anabolic effect of leucine. Neither other two branched-chain amino acids (BCAAs), valine or isoleucine, nor other amino acid and/or their metabolites show this unique feature (De Bandt and Cynober, 2006). However, there is no study evaluating the effect of exogenous HMB on BCAA metabolism, although phenomena of metabolic antagonism exists among BCAAs.

The aim of this study was to examine the effect of HMB administration on leucine and protein metabolism in whole body and to estimate changes in protein synthesis and proteolysis in selected tissues. Two tracers (L-[1-¹⁴C]leucine and L-[3,4,5-³H]phenylalanine) were used to test the possible effect of interference of HMB and leucine metabolism and to avoid its effect on interpretation of the obtained results.

2. Materials and methods

2.1. Animals and material

Male Wistar rats (BioTest, Konarovice, CR) weighing about 260 g, were housed in standardized cages in quarters with controlled temperature and a 12-h light-dark cycle and received Velaz-Altromin 1320 laboratory chow and drinking water *ad libitum*. All procedures involving animals were performed according to guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University. L-[1-¹⁴C]leucine was purchased from Amersham (Buckinghamshire, UK),

Abbreviations: HMB, beta-hydroxy-beta-methylbutyrate; BCAA, branched-chain amino acids.

* Corresponding author. Tel./fax: +420 495816335.

E-mail address: holeccek@lfhk.cuni.cz (M. Holecek).

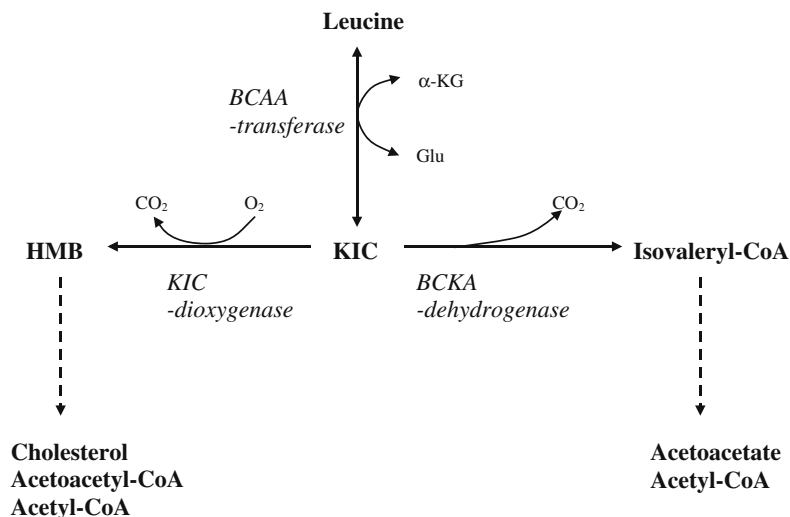


Fig. 1. Pathways of leucine metabolism. Leucine conversion to KIC is regulated by BCAA-transferase. Approximately 90% of produced KIC is oxidized by mitochondrial BCKA-dehydrogenase. The remaining KIC is oxidized to HMB by KIC-dioxygenase in cytosol. The major pathway of HMB metabolism is conversion via HMG-CoA to cholesterol.

[¹⁴C]bicarbonate was from Du Pont-NEN (Bad Homburg, Germany) and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate from Waters (Milford, MA). L-[3,4,5-³H]phenylalanine was purchased from American Radiolabeled Chemical, Inc. (St. Louis, MO, USA). HMB (calcium salt) was kindly donated by Metabolic Technologies, Inc. (Ames, IA, USA). Leucine, Folin-Ciocalteu phenol reagent, dimethylsulfoxide and albumin were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). The remaining chemicals were obtained from Lachema (Brno, CR).

2.2. Experimental design

A polyethylene cannula was inserted into the jugular vein and HMB at a dose of 0.1 g/kg b.w. was administered into the cannula (1/2 of the dose) and subcutaneously (1/2 of the dose). Control animals received a corresponding volume of the saline solution instead of HMB. Thereafter the rats fasted for 18 h. The next day, unrestrained and conscious rats were infused with a solution containing L-[1-¹⁴C]leucine (2.0 μCi/ml) and L-[3,4,5-³H]phenylalanine (10.0 μCi/ml). Solution infused to experimental animals was enriched by HMB (0.1 g/kg). A priming dose of 0.7 ml infused within 4 min 35 s was followed by a constant infusion at a rate of 0.40 ml/h for 210 min. The rate of infusion, the dose of HMB and of labeled leucine and phenylalanine were estimated on the basis of our previous studies (Kovarik et al., 2007; Holecek et al., 1997, 2006). The rats were killed by exsanguination via the abdominal aorta during 210th min from the beginning of the infusion. Afterwards the liver, gastrocnemius muscle, heart, kidney, spleen, and samples of jejunum and colon were quickly removed and immediately frozen in liquid nitrogen for measurement of protein synthesis and chymotrypsin-like activity.

2.3. Parameters of whole-body amino acid and protein metabolism

The parameters of whole body leucine metabolism were evaluated at steady-state conditions by the procedure described in detail previously (Holecek et al., 1997). The expired CO₂ was trapped at 10-min intervals between the 125th and 185th min of infusion by monoethanolamine. The average value of six measurements of ¹⁴CO₂ radioactivity in expired air at steady-state condition was used for calculations of the leucine oxidation rate. The ¹⁴CO₂ recovery factor (FR) estimated by infusion of [¹⁴C]bicarbonate was about 90% both for HMB and solvent treated animals. Leucine specific activity (SA_{Leu}), turnover (Q_{Leu}), clearance (C_{Leu}) and decarboxylation (D_{Leu}) rates were calculated using the following formulae:

$$SA_{Leu} \text{ (dpm/}\mu\text{mol)} = \frac{\text{Leu radioactivity (dpm/ml)}}{\text{Leu concentration (}\mu\text{mol/ml)}}$$

$$Q_{Leu} \text{ (}\mu\text{mol/h)} = \frac{\text{infusion rate (dpm/h)}}{SA_{Leu} \text{ in plasma (dpm/}\mu\text{mol)}}$$

$$C_{Leu} \text{ (ml/h)} = \frac{Q_{Leu} \text{ (}\mu\text{mol/h)}}{\text{plasma Leu (}\mu\text{mol/ml)}}$$

$$D_{Leu} \text{ (}\mu\text{mol/h)} = \frac{{}^{14}\text{CO}_2 \text{ production rate (dpm/h)}}{SA_{Leu} \text{ in plasma (dpm/}\mu\text{mol)} \cdot \text{FR}}$$

Whole body leucine metabolism was considered to take place within a common metabolic pool represented by free plasma leucine. Due to the fact that exogenous leucine intake (*E*) was zero in our protocol, Q_{Leu} estimates the leucine released from protein, i.e. the protein breakdown (*B*) as described by the equation:

$$Q = In + D = B + E.$$

By using this formula, rates of protein incorporation into protein (*In*), the oxidized fraction of leucine (OF = $D \cdot 100/Q$) and protein balance (PB = $In - B = E - D$) were calculated. Therefore the absolute values of leucine oxidation and protein balance are of the same value in our experimental conditions.

Using L-[3,4,5-³H]phenylalanine only Q_{Phe} estimating phenylalanine release from protein (i.e. the protein breakdown) and phenylalanine clearance can be measured under these conditions.

It has been suggested that specific activity of ketoisocaproic acid (KIC) is more relevant for calculating parameters of whole-body leucine metabolism (Mathews et al., 1982). However, the ratio of KIC to leucine specific activity is constant after number of experimental maneuvers, and no qualitative differences were observed whether the KIC or leucine specific activities were used to calculate protein turnover (Fong et al., 1994; Petrides et al., 1994). As in our conditions the measurements of leucine enrichments were more reproducible than those of KIC, probably because KIC is very unstable, we used leucine specific activities for measurement of parameters of protein turnover.

2.4. Protein synthesis

For the assessment of leucine and phenylalanine incorporations into protein, small pieces of tissue (about 0.5 g) were rinsed and homogenized in 2% (v/v) perchloric acid. The precipitated proteins were collected by centrifugation. The supernatant was used for measurement of L-[1-¹⁴C]leucine and L-[3,4,5-³H]phenylalanine specific activities. To avoid contamination by ketoisocaproate, samples were treated with 30% hydrogen peroxide, which causes the carboxyl carbon of ketoisocaproate to be released as CO₂. The pellet was washed three times and then hydrolyzed in 2 N NaOH. Aliquots were taken for protein content (Lowry et al., 1951) and radioactivity measurement. The fractional protein synthesis rates were calculated using the equation derived by Garlick et al. (1973):

$$\frac{Sb}{Si} = \frac{\lambda_i}{\lambda_i - K_s} - \frac{1 - e^{-K_s t}}{1 - e^{-\lambda_i t}} - \frac{K_s}{\lambda_i - K_s}$$

where *Sb* and *Si* are the specific activities of the protein-bound and free acid-soluble tissue leucine/phenylalanine pools, respectively, in disintegrations per minute per micromole; λ_i is the rate constant for the rate of rise of amino acid specific activity in the acid-soluble amino acid pool per day; *t* is the duration of the label infusion in days, and *K_s* is the fraction of protein mass renewed each day, in percent per day. The values of 663 μmol and 274 μmol of leucine/g protein and phenylalanine, respectively, were used for calculation of their of protein-bound specific activities (Welle, 1999).

2.5. Chymotrypsin-like activity

The chymotrypsin-like activity of the proteasome was determined using the fluorogenic substrate Suc LLVY-MCA (0.1 mM) according to the method of Gomes-Marcondes et al. (2002). Muscles were homogenized in medium containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM ATP, 5 mM MgCl₂ and 1 mM dithiothreitol. The homogenate was then centrifuged for 10 min at 18 000g at 4 °C. Cellular supernatant (0.1 ml) was incubated with substrate (0.05 mM) in a total volume of 0.2 ml of 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), with or without inhibitor, MG-132 (0.02 mM), for 1 h on ice. The reaction was terminated by addition of 80 mM sodium acetate, pH

4.3 (1 ml). The fluorescence was determined using an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 440 nm (Perkin-Elmer luminescence spectrometer LS 50 B). Standard curve was established for 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), which permitted the expression of chymotrypsin-like activity as nmol AMC/g protein/hour. The activity was adjusted for protein concentration of the sample. Only the MG-132-inhibited activity was used for the calculations.

2.6. Other techniques

Amino acid concentrations in deproteinized samples of blood plasma or tissues were determined with high-performance liquid chromatography (Waters, Milford, MA) after precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Plasma levels of urea glucose, triglycerides, and cholesterol were measured using commercial tests (Boehringer, Mannheim, Germany; Elitech, Sées, France and Lachema, Brno, CZ). The radioactivity of the samples was measured with the liquid scintillation radioactivity counter LS 6000 (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SE. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. A difference was considered significant at $P < 0.05$. Statistical software NCSS 2001 (NCSS, Kaysville, Utah) was used for the analysis.

3. Results

3.1. Blood plasma

HMB treatment induced a significant increase in total cholesterol in blood plasma. There were no differences in HDL and LDL cholesterol, atherogenicity index, triglycerides, glucose, and urea levels (Table 1).

3.2. Parameters of whole-body amino acid and protein metabolism

Using infusion of L-[1-¹⁴C]leucine was shown that HMB treatment induced a significant decrease in whole-body protein turnover, i.e. a decrease both in whole-body proteolysis and protein synthesis (Table 2). In addition, a decrease in leucine clearance was observed. The effect on protein balance, leucine oxidation and leucine oxidized fraction was not observed. The effect of

Table 1
Parameters of control and experimental animals.

	Control (n = 9)	HMB (n = 8)
Body weight (g)	261 \pm 6	268 \pm 5
<i>Blood plasma</i>		
Glucose (mmol/l)	9.13 \pm 0.30	8.69 \pm 0.40
Triglycerides (mmol/l)	1.21 \pm 0.11	1.35 \pm 0.29
Cholesterol (mmol/l)	2.04 \pm 0.08	2.33 \pm 0.08*
HDL cholesterol (mmol/l)	1.43 \pm 0.08	1.53 \pm 0.08
LDL cholesterol (mmol/l)	0.22 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04
Atherogenicity index	0.46 \pm 0.06	0.56 \pm 0.12
Urea (mmol/l)	5.27 \pm 0.37	5.01 \pm 0.27

Atherogenicity index was calculated as: (cholesterol – HDL cholesterol)/HDL cholesterol. Values are means \pm SE. Mann-Whitney test.

* $P < 0.05$.

Table 2
Effect of HMB on whole-body protein and leucine metabolism.

	Control (n = 9)	HMB (n = 8)
Proteolysis ($\mu\text{mol Leu kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	172 \pm 9	144 \pm 8*
Protein synthesis ($\mu\text{mol Leu kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	107 \pm 8	84 \pm 5*
Protein balance ($\mu\text{mol Leu kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	-65 \pm 4	-60 \pm 4
Leucine oxidation ($\mu\text{mol Leu kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	65 \pm 4	60 \pm 4
Leucine oxidized fraction (%)	38 \pm 2	42 \pm 1
Leucine clearance ($\text{ml kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	1053 \pm 36	870 \pm 52*
Proteolysis ($\mu\text{mol Phe kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	51 \pm 3	44 \pm 1
Phenylalanine clearance ($\text{ml kg}^{-1} \text{h}^{-1}$)	749 \pm 20	668 \pm 24

Values are means \pm SE. Mann-Whitney test.

* $P < 0.05$.

HMB on whole-body proteolysis and phenylalanine clearance estimated by L-[3,4,5-³H]phenylalanine was in agreement with the results obtained by labeled leucine infusion.

3.3. Chymotrypsin-like activity

A significant decrease in chymotrypsin-like activity (indicating the rate of proteasome dependent proteolysis) was observed in skeletal muscle of HMB treated animals. The changes in other tissues were not observed (Table 3).

3.4. Protein synthesis in selected tissues

There was no significant effect of HMB on protein synthesis in skeletal muscle and jejunum. A significant increase in protein synthesis was observed in the liver, while a decrease was observed in the colon. The significant decrease in protein synthesis in the heart, kidney and spleen was detected only using labeled leucine technique (Table 4).

3.5. Amino acid concentrations in blood plasma

Table 5 demonstrates that HMB treatment significantly affected amino acid concentrations in blood plasma. Concentrations of leucine, citrulline and ornithine increased, while a decrease was found in glutamate, serine, glutamine and alanine.

4. Discussion

Several studies demonstrated that supplemental HMB is well tolerated and has no adverse effects (Baxter et al., 2005). Significant increase in blood cholesterol is a clear evidence of metabolic

Table 3
Effect of HMB on chymotrypsin-like activity in proteasome.

	Control (n = 9)	HMB (n = 8)
Skeletal muscle	6.9 \pm 0.9	3.8 \pm 0.3*
Heart	1.5 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1
Liver	3.6 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3
Jejunum	0.8 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3
Colon	0.9 \pm 0.8	1.0 \pm 0.2
Kidney	6.9 \pm 0.7	5.4 \pm 0.5
Spleen	1.2 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1

Values are means \pm SE in ng AMC/h/mg protein. Mann-Whitney test.

* $P < 0.05$.

Table 4
Effect of HMB on fractional rate of protein synthesis in specific tissues.

	Tracer	Control (n = 9)	HMB (n = 8)
Muscle	Leu	0.35 \pm 0.03	0.29 \pm 0.02
	Phe	0.52 \pm 0.04	0.45 \pm 0.03
Heart	Leu	1.19 \pm 0.12	0.79 \pm 0.08*
	Phe	1.59 \pm 0.16	1.34 \pm 0.08
Liver	Leu	2.97 \pm 0.26	3.81 \pm 0.28*
	Phe	5.34 \pm 0.32	7.09 \pm 0.56*
Jejunum	Leu	6.28 \pm 0.83	4.58 \pm 0.70
	Phe	10.30 \pm 1.12	8.63 \pm 1.20
Colon	Leu	6.32 \pm 0.97	3.91 \pm 0.75*
	Phe	10.54 \pm 1.67	6.63 \pm 0.79*
Kidney	Leu	5.63 \pm 0.22	4.59 \pm 0.28*
	Phe	3.31 \pm 0.29	2.97 \pm 0.19
Spleen	Leu	4.32 \pm 0.52	2.76 \pm 0.24*
	Phe	7.53 \pm 0.72	5.93 \pm 0.42

Values are means \pm SE in %/day.

Mann-Whitney test.

* $P < 0.05$.

Table 5
Effect of HMB on amino acid concentrations in blood plasma.

	Control (n = 9)	HMB (n = 8)
Aspartate	6.0 ± 0.4	5.4 ± 0.2
Glutamate	71.3 ± 2.7	54.1 ± 3.6*
Serine	224 ± 10	190 ± 12*
Asparagine	50.8 ± 2.3	48.1 ± 2.1
Glycine	273 ± 18	273 ± 23
Glutamine	677 ± 37	574 ± 25*
Histidine	66.5 ± 3.1	66.4 ± 3.4
Taurine	123 ± 8	138 ± 9
Threonine	201 ± 10	180 ± 12
Citrulline	56.8 ± 2.2	68.0 ± 4.1*
Alanine	366 ± 23	301 ± 14*
Arginine	140 ± 7	131 ± 8
Proline	120 ± 5	105 ± 6
Tyrosine	61.8 ± 4.8	52.5 ± 2.8
Cystine	81.8 ± 2.8	83.7 ± 10.5
Valine	168 ± 12	202 ± 18
Methionine	47.6 ± 1.4	44.3 ± 1.2
Ornithine	44.1 ± 1.8	53.3 ± 2.4
Isoleucine	94.4 ± 5.4	113 ± 9
Leucine	164 ± 9	219 ± 12*
Lysine	366 ± 14	383 ± 27
Phenylalanine	68.4 ± 2.7	65.9 ± 1.9
BCAA	424 ± 18	522 ± 18*
Total AA	3,469 ± 117	3,339 ± 84

Values are means ± SE in $\mu\text{mol/L}$.

BCAA, branched-chain amino acids; AA, amino acids. Means ± SE. Mann–Whitney test.

* $P < 0.05$.

changes induced by HMB administration in our study. The observation is in agreement with presumption that HMB is metabolized to HMG-CoA and is used for de novo synthesis of cholesterol in certain tissues. It should be noted, that this observation is in discrepancy with findings of Nissen and Abumrad (1997) who observed the decrease in LDL cholesterol. Although there were no changes in plasma glucose, triglycerides, HDL and LDL cholesterol, and atherogenicity index in our study, we suppose that the possible atherogenic effect of high intake of HMB should be investigated in the long term studies also in other laboratories.

The principal result of this study is undoubtedly the finding of the decreased protein turnover, i.e. the decrease in whole-body proteolysis and protein synthesis in HMB treated animals. The main cause of decreased whole-body proteolysis is undoubtedly the decrease in proteolysis in skeletal muscle which contribute to a large part of whole-body protein metabolism. Therefore the decrease in proteolysis and not increase in protein synthesis seems the mechanism by which HMB can increase the gain of lean body mass. Insignificant changes in leucine oxidation indicate, that HMB has no or very limited effect on activity of the key enzyme in BCAA metabolism, the branched-chain keto acid dehydrogenase.

Our findings are in a good agreement with results of Ostaszewski et al. (2000) who in isolated rat and chick extensor digitorum longus and soleus muscles observed insignificant effect of HMB on protein synthesis but consistently decreased protein degradation estimated by net release of tyrosine from incubated muscles. The inhibitory effect of HMB on breakdown of structural proteins in skeletal muscle indicates also significantly decreased rise in excretion of 3-methylhistidine induced by resistance-exercise training in HMB treated weight-lifters (Nissen et al., 1996).

Changes in chymotrypsin-like activity of proteasome indicate that HMB treatment affects activity of the ubiquitin–proteasome system, the main system responsible for breakdown of intracellular proteins. Its decrease in skeletal muscle of HMB treated animals should be associated with decreased breakdown of myofibrillar protein and net increase in muscle mass. The reason, why the decrease in chymotrypsin-like activity was limited on skeletal mus-

cle, indicating exceptional role of HMB in regulating protein breakdown in muscle, is not clear. The effect may be related to tissue specific differences in leucine and HMB metabolism; i.e. low activity of BCKA dehydrogenase in muscle may drive KIC generated by BCAA aminotransferase reaction via KIC-dioxygenase and support HMB synthesis. Unfortunately, the data describing the differences in distribution and activities of KIC-dioxygenase among tissues are not available.

Changes in protein synthesis in specific tissues were mostly in agreement with decreased whole-body protein turnover, i.e. the significant decrease in protein synthesis was found in the heart, colon, kidney, and the spleen. The exception was the liver, in which the increase in protein synthesis was observed. We suppose that decreased amino acid availability due to decreased protein breakdown in skeletal muscle may be partly involved in suppression of protein synthesis in some tissues. The mechanism of the apparently important increase in protein synthesis in hepatic tissue is not clear.

The changes in plasma free amino acid levels after HMB are related to changes in protein synthesis, proteolysis and amino acid catabolism. Moderate changes in the concentration of the most plasma amino acids are in a good agreement with parallel decrease in whole-body protein synthesis and proteolysis. Considering the BCAAs as an important donor of nitrogen in synthesis of glutamate, glutamine and alanine in skeletal muscle (Harper, 1984), it can be supposed, that the increase in leucine concentration associated with decreased concentrations of glutamate, glutamine and alanine are caused by decreased conversion of leucine to ketoisocaproic acid after HMB treatment. This finding is a further evidence of practical importance of metabolic relations in metabolism of BCAA and glutamine in skeletal muscle (Holecek, 2002).

In conclusion, the main effect of HMB administration on protein metabolism seems the inhibition of proteasome dependent proteolysis in skeletal muscle associated with decreased levels of glutamate, glutamine and alanine in the blood. The data also indicate that HMB is partly responsible for inhibitory effect of exogenous leucine on proteolysis and not for its stimulatory effect on protein synthesis. Of the practical importance should be also significant influence of HMB treatment on protein synthesis in specific tissues, particularly in the liver. Further studies determining the types of hepatic proteins of which synthesis is activated by HMB treatment are needed.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

We are grateful for technical support of I. Altmannova, H. Buzkova, L. Kriesfalusyova, D. Jezkova, and R. Rysava. Many thanks to dr. Hana Skalska for help with statistical analysis. The study was supported by Research Project MSM0021620820.

References

- Baxter, J.H., Carlos, J.L., Thurmond, J., Rehani, R.N., Bultman, J., Frost, F., 2005. Dietary toxicity of calcium-hydroxy-methylbutyrate (CaHMB). *Food Chem. Toxicol.* 43, 1731–1741.
- Clark, R.H., Feleke, G., Din, M., Yasmin, T., Singh, G., Khan, F.A., Rathmacher, J.A., 2000. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 24, 133–139.
- De Bandt, J.P., Cynober, L., 2006. Therapeutic use of branched-chain amino acids in burn, trauma and sepsis. *J. Nutr.* 136, 308S–313S.

- Fong, Y., Matthews, D.E., He, W., Marano, M.A., Moldawer, L.L., Lowry, S.F., 1994. Whole body and splanchnic leucine, phenylalanine, and glucose kinetics during endotoxemia in humans. *Am. J. Physiol.* 266, R419–R425.
- Garlick, P.K., Millward, D.J., James, W.P.T., 1973. The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats. *Biochem. J.* 136, 935–945.
- Gomes-Marcondes, M.C.C., Tisdale, M.J., 2002. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* 180, 69–74.
- Harper, A.E., Miller, R.H., Block, K.P., 1984. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 4, 409–454.
- Holecek, M., 2002. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition* 18, 130–133.
- Holecek, M., Muthny, T., Kovarik, M., Sispara, L., 2006. Simultaneous infusion of glutamine and branched-chain amino acids (BCAA) to septic rats does not have more favorable effect on protein synthesis in muscle, liver, and small intestine than separate infusions. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 30, 467–473.
- Holecek, M., Sprongl, L., Skopec, F., Andrys, C., Pecka, M., 1997. Leucine metabolism in TNF- and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue. *Am. J. Physiol.* 273, E1052–E1058.
- Jówko, E., Ostaszewski, P., Jank, M., Sacharuk, J., Zieniewicz, A., Wilczak, J., Nissen, S., 2001. Creatine and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. *Nutrition* 17, 558–566.
- Kovarik, M., Muthny, T., Sispara, L., Holecek, M., 2007. Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate treatment on protein metabolism in skeletal muscle of septic rat. *Clin. Nutrition* 2 (S2), 155 (abstr).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Marcora, S., Lemmey, A., Maddison, P., 2005. Dietary treatment of rheumatoid cachexia with -hydroxy-methylbutyrate, glutamine and arginine: A randomised controlled trial. *Clin. Nutr.* 24, 442–454.
- Matthews, D.E., Schwarz, H.P., Yang, R.D., Motil, K.J., Young, V.R., Bier, D.M., 1982. Relationship of plasma leucine and -ketoisocaproate during a L-1-13C leucine infusion in man: a method for measuring human intracellular leucine tracer enrichment. *Metabolism* 31, 1105–1112.
- May, P.E., Barber, A., D'Olimpio, J.T., Hourihane, A., Abumrad, N.N., 2002. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am. J. Surg.* 183, 471–479.
- Nissen, S.L., Abumrad, N.N., 1997. Nutritional role of the leucine metabolite -hydroxy-methylbutyrate (HMB). *J. Nutr. Biochem.* 8, 300–311.
- Nissen, S.L., Sharp, R.L., 2003. Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a metaanalysis. *J. Appl. Physiol.* 94, 651–659.
- Nissen, S., Sharp, R., Ray, M., Rathmacher, J.A., Rice, D., Fuller, J.C., Connelly, A.S., Abumrad, N.N., 1996. Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J. Appl. Physiol.* 81, 2095–2104.
- Ostaszewski, P., Kostyuk, S., Balasinska, B., Jank, M., Papet, I., Glomot, F., 2000. The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens in vitro. *J. Animal Physiol. Animal Nutr.* 84, 1–8.
- Petrides, A.S., Luzi, L., DeFronzo, R.A., 1994. Time-dependent regulation by insulin of leucine metabolism in young healthy adults. *Am. J. Physiol.* 267, E361–E368.
- Smith, H.J., Mukerji, P., Tisdale, M.J., 2005. Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by {beta}-hydroxy-{beta}-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res.* 65, 277–283.
- Welle, S., 1999. Methods for studying protein metabolism in humans. In: Welle, S. (Ed.), *Human Protein Metabolism*. Springer-Verlag, New York, pp. 29–71.

10.2.1.5 Kovarik M, Muthny T, Holecek M: Beta-hydroxy-beta-metylbutyrát – od potravinového doplňku k terapii kachexie? *Klin Biochem Metab* 2007;15(36):No.4,193-199

Beta-hydroxy-beta-metylbutyrát – od potravinového doplňku k terapii kachexie?

Kovařík M.¹, Muthný T.², Holeček M.¹

¹Ústav fyziologie, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové

²Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové

SOUHRN

Beta-hydroxy-beta-metylbutyrát (HMB) je metabolitem leucinu, jenž vykazuje antikatabolické účinky a příznivě ovlivňuje imunitní systém. Mechanismus účinku nebyl dosud zcela objasněn. HMB může sloužit jako zdroj pro syntézu cholesterolu, zřejmě zasahuje také do ubikvitin-proteazomového proteolytického systému. HMB je užíván jako potravinový doplněk při silovém tréninku, zejména pro nárůst síly a množství netukové tkáně. V posledních letech se také testuje jako součást terapie kachexie různé etiologie (např. nádory, AIDS).

Klíčová slova: leucin, metabolismus, výživa, proteazom, kosterní sval.

SUMMARY

Kovařík M., Muthný T., Holeček M.: Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate – from a nutritional supplement to the therapy of cachexia?

Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) is the leucine metabolite, which shows anti-catabolic effect and beneficially affects the immune system. The mechanism of action is still not fully understood. HMB may serve as the source for cholesterol synthesis and it probably affects the ubiquitin-proteasome proteolytic system. HMB is used as a dietary supplement during resistance-training, especially for increase of power and non-fat body mass. It has been also tested in recent years as a part of cachexia treatment (cancer, AIDS, etc.).

Key words: leucine, metabolism, nutrition, proteasome, skeletal muscle.

Úvod

Beta-hydroxy-beta-metylbutyrát (HMB) je přirozeným metabolitem leucinu, k jehož popsáním účinkům patří zejména ovlivnění metabolismu proteinů a imunitního systému. Používá se jako potravinový doplněk, v posledních letech se objevují doklady, že podání HMB může zabránit rozvoji kachexie u nádorových onemocnění nebo AIDS. Cílem této práce je poskytnout přehled současných poznatků o vlastnostech, účincích a využití HMB.

Zdroje HMB

HMB v lidském těle může být jak exogenního, tak endogenního původu. Potraviny však obsahují pouze malé množství HMB. Schematický popis syntézy HMB viz obrázek 1. V organismu vzniká HMB z aminokyseliny leucinu, přeměně na HMB podléhá asi 5–10 % leucinu. Metabolismus leucinu je zahájen transaminací na alfa-ketoizokaproát (alfa-KIC) pomocí specifické BCAA (BCAA – branched-chain amino acids) aminotransferázy. Většina alfa-KIC podléhá oxidační dekarboxylaci multienzymovým komplexem BCKA (BCKA – branched-chain keto acids) dehydrogenázy. Vzniklý izovaleryl koenzym A je dále metabolizován až na beta-hydroxy-beta-metylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) [15].

Alternativní cestu oxidace alfa-KIC popsali na počátku 80. let 20. století Sabourin a Bieber [22]. Podle ní je alfa-KIC oxidován KIC-dehydrogenázou za vzniku HMB. Minoritním zdrojem HMB může být i beta-metyl-

krotonyl koenzym A, ale pouze při nadměrně zvýšených koncentracích (deficit biotinu). Van Koevinger a Nissen (1992) popsali, že alespoň u prasete je jediným zdrojem pro syntézu HMB leucin.

Farmakokinetika

Cílem studie Vukoviche et al. [23] bylo stanovit farmakokinetické parametry HMB po jeho jednorázovém perorálním podání lidem. Výsledky ukazují, že po podání 1 g HMB dosáhla maximální plazmatická koncentrace hodnoty 115 nmol/l, bylo jí dosaženo za $2,0 \pm 0,4$ h. Po podání 3 g HMB bylo maximální koncentrace (~ 480 nmol/l) dosaženo již za $1,0 \pm 0,1$ h. Hodnota plazmatického poločasu $2,4 \pm 0,1$ h byla shodná u obou dávek HMB. Po 6 hodinách bylo zaznamenáno významné navýšení koncentrace HMB v moči, jež přetrvávalo až do 36 hodin po aplikaci. Množství vyloučeného HMB záviselo na podané dávce (~14 % u 1 g HMB, ~29 % u 3 g HMB). Při kombinaci HMB s glukózou dosáhla plazmatická koncentrace maxima později ($1,9 \pm 0,2$ h) a prodloužil se plazmatický poločas ($2,7 \pm 0,2$ h), množství vyloučeného HMB do moči se však nezměnilo. Nebyl zjištěn žádný vliv aplikace HMB na plazmatické koncentrace glukózy a inzulínu. Tyto výsledky odpovídají údajům zjištěným u zvířat. U prasete nebo ovce je vyloučeno močí asi 30 % HMB, plazmatický poločas se pohybuje v rozmezí 1–3 hodiny [15].

Nejpravděpodobnější cestou metabolismu HMB je přeměna na beta-hydroxy-beta-metylglutaryl koenzym A (HMG-CoA) buď přímou karboxylací, nebo přes

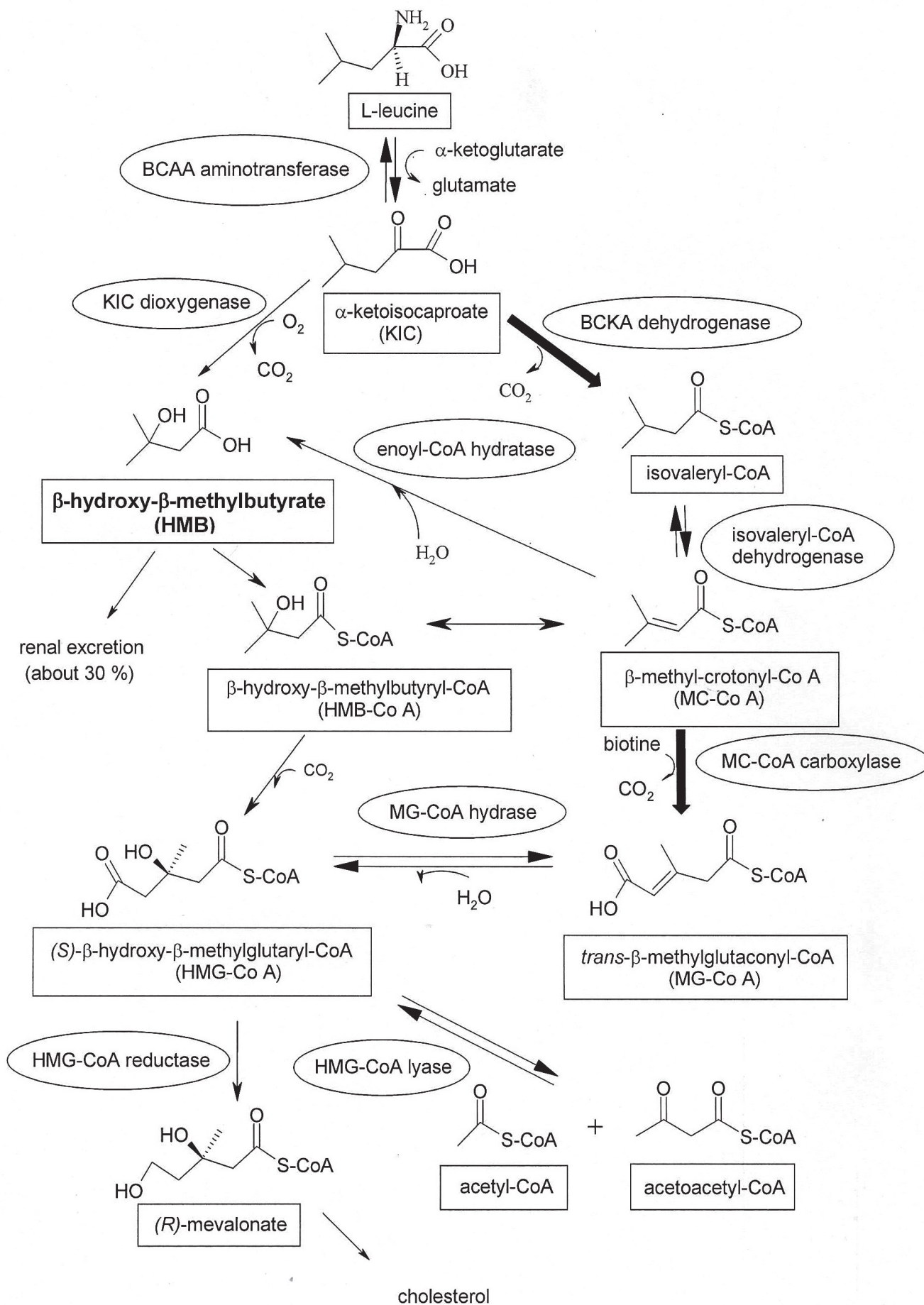


Fig. 1. HMB synthesis and metabolism
 BCAA – branched-chain amino acids
 BCKA – branched-chain keto acids

beta-metylkrotonyl koenzym A (viz obr.1). Metabolismus HMB je kromě kondenzace acetylkoenzymu A s acetoacetylkoenzymem A jediným zdrojem HMG-CoA, substrátu pro klíčový enzym syntézy cholesterolu, HMG-CoA reduktázu. *In vivo* studie ukazují, že leucin může být významným zdrojem pro syntézu cholesterolu ve svalu [15]. Přeměna HMB na cholesterol je v literatuře popsána, kvantitativní podíl HMB na syntéze cholesterolu však dosud stanoven nebyl.

Toxicita

Možnou toxicitu HMB při denním podávání po dobu 90 dnů u potkana studoval Baxter et al. [1]. Dieta u zkoumaných skupin obsahovala 1–5 % HMB. HMB bylo dobře tolerováno, nebyl zjištěn žádný nežádoucí účinek související s HMB. Tato data potvrdilo i shrnutí údajů o bezpečnosti z 9 studií, při kterých byl lidem perorálně podáván HMB v denní dávce 3 g [16].

Účinky HMB

HMB vykazuje antikatabolické, popř. anabolické (zásah do metabolismu proteinů, lipidů i sacharidů) a protizánětlivé účinky, ovlivňuje imunitní systém, v kombinaci s některými aminokyselinami brání rozvoji kachexie, případně zlepšuje hojení ran. Mechanismus působení HMB nebyl dosud zcela objasněn. Dlouhou dobu byl vysvětlován teorií spojující jeho účinky se syntézou cholesterolu. HMB může sloužit jako zdroj HMG-CoA, prekursoru pro syntézu cholesterolu, zejména v situacích, kdy buňka potřebuje jeho zvýšené množství pro syntézu nových nebo poškozených buněčných membrán. HMB by tak mohl být potřebný pro maximalizaci funkce imunitního systému, produkce mléčného tuku při laktaci nebo pro maximální růst svalů a zabránění úbytku kosterních svalů při stresových situacích [15]. V recentních pracích je účinek HMB vysvětlován zásahem do ubikvitin-proteazomového systému. Především u stavů, kdy je tento významný proteolytický systém patologicky hyperaktivován, snižuje HMB jeho aktivitu i expresi podjednotek proteazomu [25].

Vliv HMB na imunitní systém

HMB ovlivňuje aktivitu a proliferaci buněk imunitního systému i humorální složku imunity. Byl zjištěn příznivý vliv HMB na aktivitu fagocytů izolovaných z kapra a pstruha. Po přidání HMB do média v koncentraci 10–100 $\mu\text{g/ml}$ bylo pozorováno silnější respirační vzplanutí fagocytů. Při koncentracích 5–100 $\mu\text{g/ml}$ média zvyšoval HMB také schopnost fagocytů zabít živé bakterie [23]. Po přidání HMB do média bylo prokázáno zlepšení růstu a funkce i u kuřecích makrofágů. Při koncentracích 10–100 $\mu\text{g}/5 \cdot 10^4$ buněk HMB významně zvyšoval proliferaci makrofágů. Fagocytická aktivita rostla až do koncentrace 60 $\mu\text{g HMB}/5 \cdot 10^4$ buněk. HMB dále zvyšoval expresi Fc receptorů a produkci nitritů [20]. Když byl HMB přidáván brojlerům do potravy (0,01–1%), bylo pozorováno zvýšené množství makrofágů v abdominál-

ním exsudátu. Ačkoli suplementace HMB vyvolala zvýšení koncentrací dusitanů v supernatantu kultury makrofágů, nedošlo k významnému ovlivnění fagocytického potenciálu. Nebyla změněna ani schopnost eliminovat z krevního oběhu bakterie [20].

Proliferace T- a B-lymfocytů kapra a pstruha, stimulovaných mitogeny byla přidáním HMB do média aktivována, s maximem při koncentracích 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$ [23]. U brojlerů nebyl zjištěn vliv suplementace HMB na T-buňkami zprostředkovanou odpověď na podání fytohemaglutininu P, ale kožní hypersenzitivita bazofilů po injekci *pokeweed mitogenu* byla vlivem HMB zvýšená. Po intravenózní aplikaci suspenze ovčích erytrocytů došlo u HMB skupiny ke zvýšení množství protilátek proti ovčím erytrocytům během primární i sekundární odpovědi [21]. Byl také potvrzen pozitivní efekt HMB na imunizaci pstruha vakcínou proti *Yersinia ruckeri* v pokusu jak *in vitro*, tak *in vivo* (zmnožení buněk sekretujících protilátky, zvýšení celkového množství protilátek) [24].

U pacientů jednotky intenzivní péče s chronickou obstrukční plicní nemocí, připojených na mechanický ventilátor, zlepšovala již krátkodobá suplementace HMB projevy zánětu, plicní funkce a vykazovala antikatabolický účinek. U pacientů, kterým byl po dobu 7 dní podáván HMB v dávce 3 g/den, došlo ke snížení počtu leukocytů a množství C-reaktivního proteinu [5].

Vliv HMB na metabolismus

HMB vykazuje antikatabolické, respektive anabolické účinky na všechny základní typy živin. Svými účinky ovlivňuje i růst a vývoj plodu. Podání roztoku sacharidů, HMB nebo směsi HMB se sacharidy do amniové tekutiny kuřecího embrya vedlo ke zlepšení vývoje tenkého střeva. Vylíhnutá kuřata měla vyšší tělesnou hmotnost oproti kontrolní skupině (nejvyšší hmotnost pozorována u směsi HMB se sacharidy) [27]. Podání směsi HMB a sacharidů dvou- až pětinasobně zvýšilo zásoby jaterního glykogenu, zvětšená byla také hmotnost prsního svalů [29]. Podávání HMB v krmivu (0,05 g/kg) březím sviním v posledních dvou týdnech březosti a během laktace pozitivně ovlivnilo vývoj kostí narozených selat. U selat byly rovněž pozorovány zvýšené sérové koncentrace růstového hormonu a inzulínu podobného růstového faktoru 1 a zvýšená aktivita kostní alkalické fosfatázy. Po šesti měsících došlo ke zvýšení hmotnosti femuru pokusných zvířat a zlepšení mineralizace i mechanických vlastností kostní tkáně [28].

Podání diety obsahující 2 g HMB/den sviním během laktace vyvolalo zvýšení množství mléčného tuku v mléce sviní a zvýšení hmotnosti prasat [13]. Po podání HMB březím sviním byla překvapivě pozorována u narozených selat snížená plazmatická koncentrace HDL cholesterolu [28]. Dieta obsahující 3 % HMB u volů směřovala ke zvýšení obsahu tuků v *m. longissimus* a snížení poměru intramuskulární/subkutánní tuk a plazmatické koncentrace cholesterolu [31]. Shrnutí bezpečnostních údajů z klinických studií prokázalo, že v porovnání s placebem podávání HMB vyvolalo snížení množství celkového a LDL cholesterolu, doprovázené poklesem systolického tlaku, což by mohlo vést

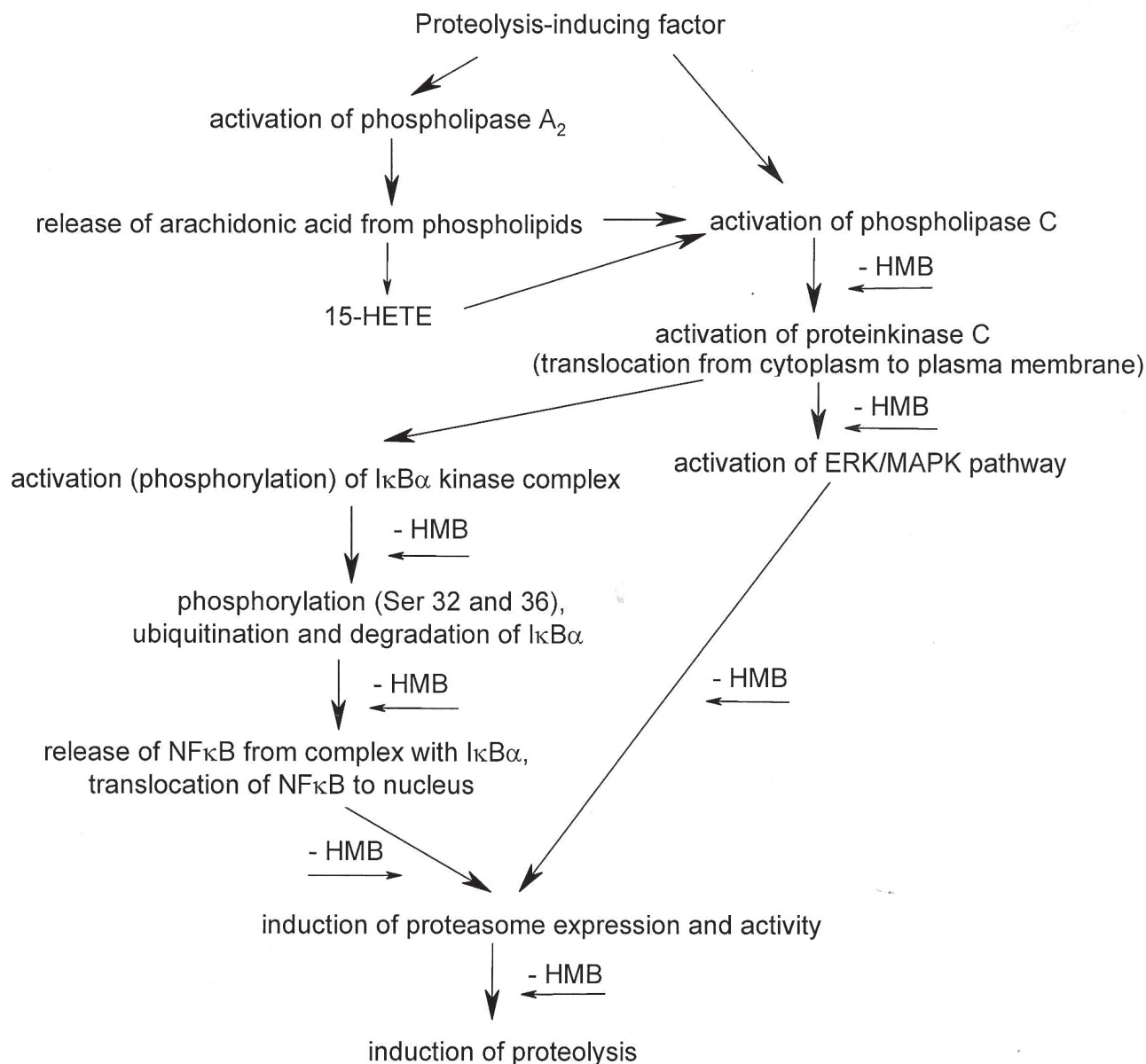


Fig. 2. Mechanism of action of HMB on model of cachexia caused by treatment with proteolysis-inducing factor
 15-HETE –15-hydroxyeicosatetraenoic acid
 NF-kappa-B – nuclear factor kappa-B
 I-kappa-B-alfa – inhibitor of NF-kappa-B
 ERK – extracellular signal-regulated kinases
 MAPK – mitogen-activated protein kinases

ke snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění [16]. Naopak u pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí došlo po aplikaci HMB k vzrůstu množství celkového cholesterolu ve srovnání s kontrolní skupinou [5].

Účinky HMB na metabolismus proteinů v izolovaných svazech potkana a kuřete popsal Ostaszewski et al. [18]. Vlivem HMB došlo k inhibici degradace proteinů, která vykazovala závislost na dávce HMB a typu svalu. Maximální snížení proteolýzy nastalo po přidání HMB o koncentraci 1 mmol/l do inkubačního média. HMB potlačilo proteolýzu více ve svazech složených z bílých než červených svalových vláken. Na rozdíl od HMB, přídavek leucinu do inkubačního média aktivoval proteosyntézu, nicméně proteolýzu významně nesnížil. V naší laboratoři nebylo prokázáno ovlivnění metabolismu proteinů

v izolovaných svazech potkana po přidání HMB do inkubačního média. Účinky se však projevily při podání *in vivo*. Ve svazech tvořených bílými svalovými vlákny aplikace HMB zvýšila obrát proteinů a snížila myofibrilární proteolýzu, ve svazech z červených vláken tlumila oxidaci leucinu a proteolytickou aktivitu proteazomu [8].

Na modelu myších myotubů (mnohojaderné válcovité trubice, vznikající splýváním rostoucích myoblastů, v jejichž sarkoplasmě se postupně tvoří myofibrily) byl nalezen příznivý vliv HMB na degradaci proteinů navozenou aplikací proteolýzu indukujícího faktoru (PIF). Efekt HMB na PIF indukovanou aktivaci proteazomu a degradaci proteinů byl porovnáván s účinkem ikosapentaenové kyseliny (EPA), známého inhibitoru PIF. Při pokusu byly použity koncentrace 25 a 50 $\mu\text{mol/l}$ u obou

zkoušených látek. Při koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ bránily HMB i EPA aktivaci celkové proteolýzy, účinek 25 $\mu\text{mol/l}$ HMB byl malý a projevil se jen u nižších hladin PIF. Hodnoty 50 $\mu\text{mol/l}$ EPA a 25 i 50 $\mu\text{mol/l}$ HMB kompletně zabránily PIF indukovanému nárůstu proteolytické aktivity proteazomu. Podobně 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrace HMB i EPA tlumily zvýšenou expresi alfa- a beta-podjednotek proteazomu, u koncentrace 25 $\mu\text{mol/l}$ nebyla zjištěna změna exprese. Co se týká mechanismu účinku, EPA na rozdíl od HMB mírnila upregulaci cytosolické fosfolipázy A_2 , a tím také uvolnění arachidonové kyseliny a tvorbu 15-hydroxykositetraenové kyseliny. Na druhou stranu HMB i EPA inhibovaly PIF navozenou aktivaci proteinkinázy C, následnou degradaci I-kappa-B-alfa a nukleární akumulaci NF-kappa-B. Potlačovaly také fosforylaci p42/44 mitogenem aktivované proteinkinázy [25]. Předpokládáný mechanismus účinku HMB na modelu kachexie navozené aplikací PIF viz obr. 2.

HMB jako potravinový doplněk u sportovců

HMB je využíván v současnosti především jako potravinový doplněk pro sportovce. Řada prací je věnována zejména vlivu HMB na metabolismus svalu při silovém tréninku. Suplementace HMB v dávce 3 g/den osobám podstupujícím intenzivní silový trénink po dobu 3 týdnů vedla ke zvýšené depozici netukové hmoty a zvýšení síly. Proteolýza ve svalech byla u HMB skupiny snížena, poklesly také plazmatické koncentrace enzymů indikujících poškození svalu (kreatin fosfokináza a laktát dehydrogenáza) nebo plazmatické koncentrace esenciálních aminokyselin, ve srovnání s kontrolní skupinou [14]. Také výsledky dalších studií naznačují, že HMB snižuje poškození svalu navozené cvičením. U skupiny suplementované HMB byla po 20 km běhu zjištěna významně nižší sérová aktivita laktát dehydrogenázy a kreatin fosfokinázy [7]. Panton et al. prokázali, že suplementace HMB v kombinaci se čtyřtýdenním tréninkovým programem zvyšovala sílu horní části těla a minimalizovala svalové poškození nezávisle na pohlaví či tréninkovém statutu [19]. Lze ovšem nalézt také studie, které neprokázaly příznivý vliv podání HMB na nárůst síly, netukové tkáně nebo snížení hodnot markerů buněčného poškození u vrcholových sportovců [4, 9].

Vliv dietních suplementů při silovém tréninku shrnuje metaanalýza, jež prokázala statisticky významný nárůst netukové tělesné hmoty a síly pouze u 2 z 250 zkoumaných substancí, a to u HMB a kreatinu. Celkem 9 studií zahrnujících suplementaci HMB splnilo kritéria, ve všech byl podáván HMB v dávce 3 g/den. HMB i kreatin vykazovaly přibližně dvojnásobný nárůst netukové tělesné hmoty oproti placebo, obě látky však působí jiným mechanismem účinku. Zatímco kreatin zřejmě stimuluje proteosyntézu zvětšením buněčného objemu, HMB spíše snižuje odbourávání buněčných proteinů a slouží jako prekurzor pro syntézu cholesterolu buněčných membrán, a tím ovlivňuje buněčnou integritu [17]. Hypotézu o rozdílném mechanismu působení podporuje také zjištění o aditivním účinku HMB a kreatinu při silovém tréninku. Po 3 týdnech byl zjištěn vzrůst netukové tělesné hmoty oproti placebo –

efekt kreatinu byl signifikantní, účinek kreatinu a HMB byl aditivní. Během cvičení došlo také k nárůstu síly (nejvyšší nárůst u kombinace kreatin + HMB). HMB snížil cvičením navozený vzrůst sérové kreatin fosfokinázy, tento účinek byl však vlivem kreatinu antagonizován. Na rozdíl od kreatinu byl HMB schopen snížit plazmatickou koncentraci močoviny a množství dusíku vyloučeného močí ve formě močoviny [6].

HMB v terapii proteokatabolických onemocnění

V posledních letech se zkoumá možnost terapeutického využití HMB při léčbě a prevenci rozvoje kachexie. Nejčastěji se testuje kombinace HMB s argininem (Arg) a glutaminem (Gln), popř. HMB s Arg a lysinem (Lys).

Účinky HMB byly popsány na modelu kachexie navozené tumorem MAC16 u myší. Dávka HMB větší než 0,125 g/kg významně snížila ztráty hmotnosti, mírně snížila i rychlost růstu tumoru. Změna v příjmu potravy nebo tekutin nebyla pozorována. Podání HMB nebo kombinace se suboptimální dávkou EPA (0,6 g/kg) mělo mírně nižší účinnost než samotné podání EPA. U všech pokusných skupin byl zjištěn vzrůst vlhké hmotnosti *m. soleus* oproti kontrole. Degradace proteinů v tomto svalu byla snížena přibližně stejně jak u HMB, tak u EPA; kombinace nevykazovala synergistický efekt. Analýza tělesné skladby prokázala, že HMB zvýšil množství netukové tkáně. U zvířat s tumorem snižovaly HMB i EPA zvýšenou aktivitu a expresi alfa, beta a ATPázových podjednotek proteazomu. Kombinace HMB a EPA snižovala expresi těchto podjednotek výrazněji než v případě jednotlivých látek. HMB na rozdíl od EPA byl schopný kromě snížení degradace proteinů také stimulovat proteosyntézu [26].

Obdobné výsledky byly nalezeny u pacientů s rozvinutým solidním tumorem (nejčastěji gastrointestinální lokalizace), kde podání kombinace HMB-Arg-Gln potlačilo rozvoj kachexie. Již po 4 týdnech podávání směsi obsahující 3 g HMB, 14 g Gln a 14 g Arg byl zjištěn přírůstek tělesné hmotnosti, jenž byl způsoben především zvýšením množství netukové tkáně. Za stejnou dobu došlo u placebo skupiny ke ztrátě tělesné hmotnosti a netukové tkáně. Účinek směsi HMB-Arg-Gln na nárůst netukové tkáně se udržel po dobu 24 týdnů. Nebyl zjištěn negativní vliv léčby na incidenti nežádoucích účinků nebo kvalitu života [12].

Cílem studie Clarka et al. bylo zjistit, zda kombinace HMB-Arg-Gln může ovlivnit rozvoj atrofie kosterního svalstva u pacientů s AIDS [2]. Po 8 týdnech došlo u pokusné skupiny k nárůstu tělesné hmotnosti, přírůstek byl dán zejména netukovou hmotou. U placebo skupiny nastala ztráta netukové tkáně, přesto díky zvýšení množství tuku tělesná hmotnost mírně vzrostla.

Práce Flakolla et al. si kladla za cíl zjistit, zda směs nutrientů dokáže zpomalit degradaci proteinů a postupnou ztrátu svalů u starších žen (nad 60 let) [3]. Po 12 týdnech podávání směsi obsahující 2 g HMB, 5 g Arg a 1,5 g Lys bylo zjištěno u pokusné skupiny zlepšení v „get-up-and-go“ funkčním testu, zatímco ve skupině dostávající placebo nedošlo v tomto testu ke změně. Toto zlepšení funkčnosti bylo doprovázeno zvětšením

obvodu paže, síly nohy a síly stisku ruky a pozitivním trendem v přírůstku množství netukové hmoty. Celotělová proteosyntéza, na rozdíl od placebo skupiny, v pokusné skupině vzrostla asi o 20 %.

Kuhls et al. zjišťovali vliv HMB u polytraumat [10]. Kromě standardní výživy kanylou dostávali pacienti jednu ze tří izonitrogeních suplementací: HMB, HMB-Arg-Gln nebo placebo. Ačkoliv nebyl mezi skupinami zjištěn rozdíl v poměru 3-methylhistidinu (marker proteolýzy kontraktálních proteinů ve svalu) a kreatininu v moči (indikátor množství kosterního svalu), byl objeven rozdíl v dusíkové bilanci. V placebo skupině dosahovala dusíková bilance mezi prvními a posledním týdnem hospitalizace nejvíce záporných hodnot. Suplementace směsí HMB-Arg-Gln vedla ke zlepšení dusíkové bilance, podání samotného HMB vyvolalo další zmenšení úbytku dusíku.

Oproti jiným typům kachexie, u pacientů s revmatoidní artritidou nebyla prokázána vyšší účinnost směsi HMB-Arg-Gln ve srovnání s placebem [11].

Studium podávání směsi HMB-Arg-Gln se neomezuje pouze na terapii kachexie. Testován byl také možný zásah do akumulace kolagenu v ráně. Dobrovolníkům starším 70 let byly subkutánně implantovány 2 sterilní katétry. Sedm a čtrnáct dní po implantaci byly katétrů odstraněny a byl stanoven hydroxyprolin (index akumulace kolagenu) a aminodusík (index depozice proteinů). Směs HMB-Arg-Gln byla dobře tolerována, její podání vedlo ke zvýšení plazmatických koncentrací argininu a ornitinu a nárůstu depozice kolagenu, zvýšená akumulace proteinů ovšem pozorována nebyla [33].

Suplementace směsí HMB-Arg-Gln vedla také k příznivému ovlivnění imunitního systému. U pacientů s AIDS došlo u pokusné skupiny kromě zamezení rozvoje kachexie také ke zvýšení počtu CD3 CD8 pozitivních buněk a poklesu počtu virových partikulí [2]. U zraněných pacientů z HMB skupiny kromě změny dusíkové bilance postupně klesalo SIRS (systemic inflammatory response syndrome) skóre, což naznačuje zmenšení projevu zánětu [10].

Závěr

HMB je pro lidský organismus přirozená látka vykazující příznivé účinky na metabolismus, imunitní systém nebo hojení ran. Dosud nebyly zjištěny nežádoucí účinky, jež by přímo souvisely s jeho podáváním. S tím, jak v posledních letech rostou důkazy o účinnosti HMB a znalosti jeho mechanismu účinku, rozšiřuje se také spektrum možného použití. V příštích letech se proto může stát z potravinového doplňku látkou používanou v terapii kachexie, sepse nebo hojení ran.

Literatura:

1. **Baxter, J. H., Carlos, J. L., Thurmond, J., Rehani, R. N., Bultman, J., Frost, D.** Dietary toxicity of calcium beta-hydroxy-beta-methyl butyrate (CaHMB). *Food Chem. Toxicol.*, 2005, 43, 12, p. 1731–1741.
2. **Clark, R. H., Feleke, G., Din, M. et al.** Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 2000, 24, 3, p. 133–139.
3. **Flakoll, P., Sharp, R., Baier, S., Levenhagen, D., Carr, C., Nissen, S.** Effect of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and lysine supplementation on strength, functionality, body composition, and protein metabolism in elderly women. *Nutrition*, 2004, 20, 5, p. 445–451.
4. **Hoffman, J. R., Cooper, J., Wendell, M., Im, J., Kang, J.** Effects of beta-hydroxy beta-methylbutyrate on power performance and indices of muscle damage and stress during high-intensity training. *J. Strength. Cond. Res.*, 2004, 18, 4, p. 747–752.
5. **Hsieh, L. C., Chien, S. L., Huang, M. S., Tseng, H. F., Chang, C. K.** Anti-inflammatory and anticatabolic effects of short-term beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation on chronic obstructive pulmonary disease patients in intensive care unit. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2006, 15, 4, p. 544–550.
6. **Jowko, E., Ostaszewski, P., Jank, M. et al.** Creatine and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) additively increase lean body mass and muscle strength during a weight-training program. *Nutrition*, 2001, 17, 7–8, p. 558–566.
7. **Knitter, A. E., Panton, L., Rathmacher, J. A., Petersen, A., Sharp, R.** Effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle damage after a prolonged run. *J. Appl. Physiol.*, 2000, 89, 4, p. 1340–1344.
8. **Kovarik, M., Muthny, T., Sispera, L., Holecek, M.** Effects of 3-hydroxy-3-methylbutyrate treatment on protein and amino acid metabolism in two types of rat skeletal muscle. In Abstract Book of 28th ESPEN Congress. Istanbul (Turkey), 2006, p. 182.
9. **Kreider, R. B., Ferreira, M., Wilson, M., Almada, A.** Effects of calcium beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation during resistance-training on markers of catabolism, body composition and strength. *Int. J. Sports Med.*, 1999, 20, 8, p. 503–509.
10. **Kuhls, D. A., Rathmacher, J. A., Musngi, M. D. et al.** Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation in critically ill trauma patients. *J. Trauma*, 2007, 62, 1, p. 125–131; discussion 131–132.
11. **Marcora, S., Lemmey, A., Maddison, P.** Dietary treatment of rheumatoid cachexia with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, glutamine and arginine: a randomised controlled trial. *Clin. Nutr.*, 2005, 24, 3, p. 442–454.
12. **May, P. E., Barber, A., D'Olimpio, J. T., Hourihane, A., Abumrad, N. N.** Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am. J. Surg.*, 2002, 183, 4, p. 471–479.
13. **Nissen, S., Faidley, T. D., Zimmerman, D. R., Izard, R., Fisher, C. T.** Colostral milk fat percentage and pig performance are enhanced by feeding the leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methyl butyrate to sows. *J. Anim. Sci.*, 1994, 72, 9, p. 2331–2337.
14. **Nissen, S., Sharp, R., Ray, M. et al.** Effect of leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on muscle metabolism during resistance-exercise training. *J. Appl. Physiol.*, 1996, 81, 5, p. 2095–2104.
15. **Nissen, S. L., Abumrad, N. N.** Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB). *J. Nutr. Biochem.*, 1997, 8, 6, p. 300–311.

16. **Nissen, S., Sharp, R. L., Panton, L., Vukovich, M., Trappe, S., Fuller, J. C., Jr.** Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation in humans is safe and may decrease cardiovascular risk factors. *J. Nutr.*, 2000, 130, 8, p. 1937–1945.
17. **Nissen, S. L., Sharp, R. L.** Effect of dietary supplements on lean mass and strength gains with resistance exercise: a meta-analysis. *J. Appl. Physiol.*, 2003, 94, 2, p. 651–659.
18. **Ostaszewski, P., Kostiuk, S., Balasinska, B., Jank, M., Papet, I., Glomot, F.** The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 2000, 84, p. 1–8.
19. **Panton, L. B., Rathmacher, J. A., Baier, S., Nissen, S.** Nutritional supplementation of the leucine metabolite beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (hmb) during resistance training. *Nutrition*, 2000, 16, 9, p. 734–739.
20. **Peterson, A. L., Qureshi, M. A., Ferket, P. R., Fuller, J. C., Jr.** In vitro exposure with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate enhances chicken macrophage growth and function. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1999, 67, 1, p. 67–78.
21. **Peterson, A. L., Qureshi, M. A., Ferket, P. R., Fuller, J. C., Jr.** Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 1999, 21, 2, p. 307–330.
22. **Sabourin, P. J., Bieber, L. L.** The mechanism of alpha-ketoisocaproate oxygenase. Formation of beta-hydroxyisovalerate from alpha-ketoisocaproate. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 13, p. 7468–7471.
23. **Siwicki, A. K., Fuller, J. C., Jr, Nissen, S., Ostaszewski, P., Studnicka, M.** In vitro effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on cell-mediated immunity in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2000, 76, 3–4, p. 191–197.
24. **Siwicki, A. K., Morand, M., Fuller, J. C., Jr, Nissen, S., Kazun, K., Glombski, E.** Influence of HMB (beta-hydroxy-beta-methylbutyrate) on antibody secreting cells (ASC) after in vitro and in vivo immunization with the anti-Yersinia ruckeri vaccine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Res.*, 2001, 32, 5, p. 491–498.
25. **Smith, H. J., Wyke, S. M., Tisdale, M. J.** Mechanism of the attenuation of proteolysis-inducing factor stimulated protein degradation in muscle by beta-hydroxy-beta-methylbutyrate. *Cancer Res.*, 2004, 64, 23, p. 8731–8735.
26. **Smith, H. J., Mukerji, P., Tisdale, M. J.** Attenuation of proteasome-induced proteolysis in skeletal muscle by {beta}-hydroxy-{beta}-methylbutyrate in cancer-induced muscle loss. *Cancer Res.*, 2005, 65, 1, p. 277–283.
27. **Tako, E., Ferket, P. R., Uni, Z.** Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. *Poult. Sci.*, 2004, 83, 12, p. 2023–2028.
28. **Tatara, M. R., Śliwa, E., Krupski, W.** Prenatal programming of skeletal development in the offspring: Effects of maternal treatment with β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on femur properties in pigs at slaughter age. *Bone*, 2007, 40, 6, p. 1615–1622.
29. **Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., Kedar, O.** In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poult. Sci.*, 2005, 84, 5, p. 764–770.
30. **Van Koevering, M., Nissen, S.** Oxidation of leucine and alpha-ketoisocaproate to beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in vivo. *Am. J. Physiol.*, 1992, 262, 1, Pt 1, p. E27–31.
31. **Van Koevering, M. T., Dolezal, H. G., Gill, D. R. et al.** Effects of beta-hydroxy-beta-methyl butyrate on performance and carcass quality of feedlot steers. *J. Anim. Sci.*, 1994, 72, 8, p. 1927–1935.
32. **Vukovich, M. D., Slater, G., Macchi, M. B. et al.** Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) kinetics and the influence of glucose ingestion in humans. *J. Nutr. Biochem.*, 2001, 12, 11, p. 631–639.
33. **Williams, J. Z., Abumrad, N., Barbul, A.** Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Ann. Surg.*, 2002, 236, 3, p. 369–374; discussion 374–375.

Práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM 0021620820 a projektu GA UK 7322/2007.

Do redakce došlo 26. 6. 2007.

Adresa pro korespondenci:
Mgr. Miroslav Kovařík
Ústav fyziologie
Šimkova 870
500 38 Hradec Králové
e-mail: kovarikm@lfhk.cuni.cz

10.2.1.6 Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L: Simultaneous infusion of glutamine and branched-chain amino acids (BCAA) to septic rats does not have more favorable effect on protein synthesis in muscle, liver, and small intestine than separate infusions. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006;30(6):467-73

Original Communications

Simultaneous Infusion of Glutamine and Branched-Chain Amino Acids (BCAA) to Septic Rats Does Not Have More Favorable Effect on Protein Synthesis in Muscle, Liver, and Small Intestine Than Separate Infusions

Milan Holecek, MD; Tomas Muthny, MS; Miroslav Kovarik, MS; and Ludek Sispera, PhD

From the Department of Physiology and Department of Biochemistry, Charles University, Medical Faculty, Hradec Kralove, Czech Republic

ABSTRACT. *Background:* Glutamine and branched-chain amino acids (BCAA; valine, leucine, and isoleucine) are used as nutrition supplements in the treatment of proteocatabolic illness. We hypothesized that simultaneous administration of BCAA and glutamine affects protein metabolism more significantly than separate administration. In the present study, we evaluated their effect on protein synthesis in skeletal muscle, liver, and jejunum of septic rats. *Methods:* Twenty-four hours after induction of sepsis by subcutaneous injection of turpentine, the rats were infused for 6 hours with 5 mL of 1.75% glutamine, 1.75% BCAA, 1.75% glutamine + BCAA, or saline solution. The control group consisted of intact rats infused with saline. Protein synthesis was measured at the end of infusion by a "flooding method" with [3,4,5-³H]phenylalanine. *Results:* In turpentine-treated animals, we observed a decrease in glutamine concentration in

blood plasma and skeletal muscle, a decrease in BCAA concentration in liver and jejunum, and a decrease in protein synthesis in all tissues. Glutamine or glutamine + BCAA infusion increased glutamine concentration in plasma and muscle and stimulated protein synthesis in the liver. The BCAA infusion enhanced concentrations of BCAA in plasma and tissues, but the effect of BCAA on protein synthesis was insignificant. Synergistic effect of simultaneous infusion of glutamine and BCAA on protein synthesis was not observed. *Conclusions:* We conclude that glutamine infusion to rats with septic injury may significantly improve impaired protein synthesis in the liver and that there is no synergistic effect of glutamine and BCAA infusion on protein synthesis in skeletal muscle, liver, and jejunum. (*Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 30:467-473, 2006)

Severe illness such as sepsis, trauma, and burn injury is frequently associated with protein wasting caused by complex action of cytokines, glucocorticoids, acidosis, and anorexia. Treatment of this metabolic derangement is difficult, and various nutrients, hormones, and drugs have been studied. Branched-chain amino acids (BCAA; valine, leucine, and isoleucine) and glutamine belong among substances used frequently as nutrition supplements in the treatment of severe illness.

The BCAA are essential amino acids that serve as an essential substrate and important regulator in synthesis of body proteins and represent the major nitrogen source for glutamine and alanine synthesis in muscle.¹ Observation of activated oxidation of BCAA in proteocatabolic states and their unique metabolic properties were rational arguments that led to the use of BCAA-enriched solutions in patients with hepatic encephalopathy, sepsis, renal failure, and trauma.^{2,3} In addition, recent studies showed the unique specificity of leucine in signaling to stimulate protein synthesis in

skeletal muscle.⁴ Unfortunately, the clinical data evaluating the effect of BCAA-enriched solutions are controversial, and the utility of BCAA in treatment of proteocatabolic illness remains an open problem.^{5,6}

Glutamine, besides its role in acid-base homeostasis and in gluconeogenesis, acts as a "nitrogen shuttle" among organs, as an important fuel for rapidly dividing cells such as enterocytes and cells of the immune system, and as a precursor for the synthesis of nucleotides. A number of researchers have found that glutamine can be a potent enhancer of the heat stress response and that glutamine could be used to enhance heat shock protein expression and attenuate injury in the critically ill.^{7,8} Several studies have reported improvements in clinical outcome and in nitrogen balance when glutamine itself, glutamine-containing dipeptides, or α -ketoglutarate has been given to critically ill patients.^{5,9-11} However, the mechanism by which glutamine administration affects protein balance is not yet completely clear.¹²

Considering that BCAA are an important precursor of glutamine synthesis in skeletal muscle¹³ and that glutamine administration inhibits leucine oxidation,¹⁴ it may be suggested that simultaneous administration of BCAA and glutamine may affect protein metabolism more significantly than separate administration. However, we did not find any study assessing this practi-

Received for publication February 8, 2006.

Accepted for publication June 19, 2006.

Correspondence: Milan Holecek, MD, Department of Physiology, Charles University School of Medicine, Simkova 870, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic. Electronic mail may be sent to holecek@fhk.cuni.cz.

cally important question of therapeutic approach. Therefore, the aim of the present study was to compare the effect of the separate and simultaneous administration of glutamine and BCAA on protein synthesis in septic injury. We studied the response of skeletal muscle, liver, and jejunum (ie, tissues that have the most important role in whole-body protein and amino acid metabolism).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (BioTest, Konarovice, CR) weighing approximately 250 g (2 months old) were housed in standardized cages in quarters with controlled temperature and a 12-hour light-dark cycle, and received Velaz-Altromin 1320 laboratory chow (Velaz, Prague, CR) and drinking water *ad libitum*. All procedures involving animals were performed according to guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University.

Materials

L-[3,4,5-³H]Phenylalanine was purchased from American Radiolabeled Chemical, Inc (St. Louis, MO). Turpentine oil, amino acids, Folin-Ciocalteu phenol reagent, and albumin were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). The remaining chemicals were obtained from Lachema (Brno, Czech Republic).

Experimental Design

A polyethylene cannula was inserted into the jugular vein under light diethyl ether narcosis 24 h before the beginning of the experiment to exclude the effect of stress from surgery. At the same session, animals were injected subcutaneously with saline (control animals, $n = 6$) or turpentine oil at a dose of 0.5 mL/100 g BW (septic rats, $n = 28$). Thereafter, the rats fasted for 24 hours. The next day, conscious unrestrained rats were infused intravenously for 6 hours with 5 mL of saline ($n = 6$ in control group, $n = 7$ in septic group), 1.75% glutamine solution ($n = 7$), 1.75% BCAA solution (33.3% valine, 42.6% of leucine, and 24.1% of isoleucine; $n = 7$), or 1.75% glutamine + BCAA solution (glutamine and BCAA solutions mixed in ratio 1:1). The rate of infusion was based on our previous experiments.¹⁴ Ten minutes before the killing, the rats were injected with a flooding dose of L-[3,4,5-³H] phenylalanine (50 μ Ci/100 g BW) combined with unlabeled D-phenylalanine (150 μ mol/100 g BW).¹⁵ The rats were killed by exsanguination *via* the abdominal aorta. Afterwards, the gastrocnemius muscle, liver, and jejunum were quickly removed and immediately frozen in liquid nitrogen.

Tissue Protein Synthesis and Protein Content

The samples for measurement of protein synthesis were processed as described elsewhere.¹⁶ The fraction of protein mass renewed each day (k_s , % per day) was calculated according to the formula derived by McNurlan et al¹⁷:

$$k_s = (S_b \times 100)/(t \times S_a)$$

where S_b and S_a are the specific radioactivities (dpm/nanomole) of protein-bound phenylalanine and tissue-free phenylalanine in the acid-soluble fraction of tissue homogenates, respectively, and t is the time (days) between injection of isotope and immersion of tissue into the liquid nitrogen. The value of 274 μ mol phenylalanine/g protein was used for calculation of protein-bound phenylalanine specific activity.¹⁸ Protein content was measured according to Lowry et al.¹⁹

Other Techniques

Amino acid concentrations in deproteinized samples of blood plasma or tissues were determined with high-performance liquid chromatography (Aliance, 2695, Waters, Milford, MA, 2475) after derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (Waters, Milford, MA). The radioactivity of the samples was measured with a liquid scintillation radioactivity counter LS 6000 (Beckman Instruments, Fullerton, CA).

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean \pm SE. The effect of sepsis was evaluated using F test and t -test for independent samples (comparison of saline-infused control and saline-infused septic rats). The effects of glutamine and BCAA solution on protein synthesis in septic rats were evaluated using ANOVA and Bonferroni tests (comparison among saline and amino acid infused septic rats). Statistical software NCSS 2001 (NCSS, Kaysville, UT) was used for the analysis. Differences were considered significant at $p < .05$.

RESULTS

There were no significant changes in body weight and glycemia either between control and septic animals or among septic animals infused by tested solutions (data not shown). It was demonstrated in several studies that turpentine treatment has no significant effect on biochemical markers of tissue injury in blood plasma.²⁰ The effect of separate or simultaneous infusions of glutamine and BCAA on amino acid concentrations in blood plasma and tissues is demonstrated in Tables I–IV. Because phenylalanine administration affected concentration of tyrosine in plasma and liver (probably due to phenylalanine metabolism in liver), we subtracted tyrosine and phenylalanine from the sum of amino acid concentrations (in addition to subtraction of infused glutamine and BCAA) in calculation of the effect of glutamine or BCAA infusion on aminoacidemia.

In turpentine oil-treated animals, a significant decrease in a number of amino acid concentrations was observed in plasma, skeletal muscle, and jejunum. In blood plasma (Table I), a significant decrease in aminoacidemia was caused by decreased concentrations of serine, glycine, glutamine, histidine, threonine, cystine, ornithine, and lysine, whereas glutamate concentration increased. Both in skeletal muscle and jeju-

TABLE I
Amino acid concentrations in blood plasma

	Control saline infusion (n = 6)	Sepsis			
		Saline infusion (n = 7)	Amino acid infusion		
			Gln (n = 7)	BCAA (n = 7)	Gln + BCAA (n = 7)
Aspartate	13 ± 2	16 ± 2	18 ± 2	18 ± 3	21 ± 2
Glutamate	154 ± 12	209 ± 20*	262 ± 25	246 ± 17	331 ± 21†‡
Serine	275 ± 4	202 ± 11*	208 ± 5	165 ± 10†§	185 ± 8
Asparagine	56 ± 3	43 ± 5	61 ± 8	38 ± 4	54 ± 8
Glycine	309 ± 6	238 ± 21*	225 ± 18	206 ± 19	226 ± 16
Glutamine	787 ± 28	676 ± 32*	1187 ± 52†	741 ± 49§	1089 ± 33†‡
Histidine	88 ± 2	79 ± 4*	88 ± 2	79 ± 6	89 ± 3
Taurine	218 ± 25	207 ± 14	192 ± 18	246 ± 20	244 ± 23
Citrulline	66 ± 8	55 ± 3	62 ± 4	64 ± 6	66 ± 7
Threonine	227 ± 11	171 ± 10*	178 ± 5	123 ± 8†§	113 ± 8†§
Alanine	442 ± 34	444 ± 51	441 ± 40	413 ± 37	424 ± 52
Proline	124 ± 14	106 ± 12	101 ± 6	88 ± 7	93 ± 6
Tyrosine	324 ± 13	357 ± 26	305 ± 9	293 ± 18†	277 ± 12†
Cystine	90 ± 4	64 ± 7*	61 ± 4	57 ± 2	58 ± 5
Valine	174 ± 8	160 ± 11	160 ± 9	735 ± 41†§	677 ± 39†§
Methionine	50 ± 4	44 ± 3	42 ± 1	35 ± 2	41 ± 3
Ornithine	51 ± 5	35 ± 3*	38 ± 1	37 ± 4	39 ± 4
Isoleucine	85 ± 5	87 ± 7	92 ± 6	298 ± 21†§	266 ± 18†§
Leucine	139 ± 10	133 ± 10	143 ± 8	536 ± 35†§	481 ± 31†§
Lysine	342 ± 14	276 ± 18*	252 ± 13	241 ± 18	226 ± 12
Phenylalanine	944 ± 61	789 ± 56	859 ± 49	903 ± 43	851 ± 42
Derived values					
BCAA	399 ± 22	381 ± 28	395 ± 22	1570 ± 98†§	1424 ± 88†§
Total	4957 ± 106	4391 ± 186*	4975 ± 119	5561 ± 185†	5852 ± 176†§
Total-GVLIPT	2503 ± 88	2188 ± 123*	2229 ± 88	2055 ± 92	2210 ± 148

Mean ± SE in $\mu\text{mol/L}$. BCAA, branched-chain amino acids; Gln, glutamine; Total-GVLIPT, the sum of amino acid concentrations without glutamine, BCAA (valine, leucine, isoleucine), phenylalanine, and tyrosine.

*The difference between saline-infused control and septic rats (t -test, $p < .05$). The effect of Gln, BCAA, or Gln + BCAA infusion in septic rats (Bonferroni test): † $p < .05$, Gln or BCAA or Gln + BCAA vs saline; § $p < .05$, BCAA or Gln + BCAA vs Gln; ‡ $p < .05$, Gln + BCAA vs BCAA.

TABLE II
Amino acid concentrations in gastrocnemius muscle

	Control saline infusion (n = 6)	Sepsis			
		Saline infusion (n = 7)	Amino acid infusion		
			Gln (n = 7)	BCAA (n = 7)	Gln + BCAA (n = 7)
Aspartate	262 ± 26	313 ± 46	362 ± 44	310 ± 45	368 ± 36
Glutamate	927 ± 80	1022 ± 123	1271 ± 49	1473 ± 288	1502 ± 211
Serine	772 ± 39	536 ± 27*	573 ± 37	366 ± 19†‡	396 ± 25†‡
Asparagine	219 ± 13	185 ± 9*	230 ± 20	132 ± 5†‡	158 ± 14‡
Glycine	4529 ± 199	2816 ± 282*	3099 ± 326	2613 ± 294	2599 ± 254
Glutamine	2678 ± 104	2191 ± 168*	3127 ± 204†	1915 ± 160‡	2524 ± 95‡§
Histidine	215 ± 11	185 ± 10	205 ± 19	146 ± 8‡	152 ± 12‡
Threonine	475 ± 15	312 ± 14*	376 ± 26	226 ± 12†‡	217 ± 19†‡
Alanine	2758 ± 179	2417 ± 104	2635 ± 111	2509 ± 134	2539 ± 127
Proline	715 ± 32	686 ± 12	698 ± 17	668 ± 38	739 ± 26
Tyrosine	260 ± 11	311 ± 22	257 ± 16	231 ± 14†	242 ± 10†
Valine	206 ± 11	212 ± 12	228 ± 17	878 ± 194†‡	719 ± 42†‡
Methionine	72 ± 2	77 ± 5	80 ± 5	61 ± 4‡	66 ± 5
Ornithine	49 ± 9	29 ± 2*	27 ± 2	26 ± 4	23 ± 2
Isoleucine	107 ± 8	125 ± 8	141 ± 12	418 ± 20†‡	309 ± 20
Leucine	172 ± 12	182 ± 12	204 ± 18	717 ± 214†‡	524 ± 31
Lysine	524 ± 32	326 ± 39*	353 ± 55	257 ± 16	212 ± 21‡
Phenylalanine	1261 ± 96	1146 ± 79	1164 ± 55	1190 ± 30	1121 ± 22
Derived values					
BCAA	484 ± 31	520 ± 32	572 ± 47	2012 ± 529†‡	1553 ± 93†‡
Total	16,200 ± 490	13,071 ± 330*	15,030 ± 746	14,137 ± 839	14,410 ± 404
Total-GVLIPT	11,517 ± 456	8904 ± 265*	9911 ± 624	8788 ± 417	8971 ± 353

Mean ± SE in nmol/g of muscle. BCAA, branched-chain amino acids; Gln, glutamine; Total-GVLIPT, the sum of amino acid concentrations without glutamine, BCAA (valine, leucine, isoleucine), phenylalanine, and tyrosine.

*The difference between saline-infused control and septic rats (t -test, $p < .05$). The effect of Gln, BCAA, or Gln + BCAA infusion in septic rats (Bonferroni test): † $p < .05$, Gln or BCAA or Gln + BCAA vs saline; ‡ $p < .05$, BCAA or Gln + BCAA vs Gln; § $p < .05$, Gln + BCAA vs BCAA.

TABLE III
Amino acid concentrations in liver

	Control saline infusion (n = 6)	Sepsis			
		Saline infusion (n = 7)	Amino acid infusion		
			Gln (n = 7)	BCAA (n = 7)	Gln + BCAA (n = 7)
Aspartate	701 ± 27	999 ± 117*	1173 ± 102	950 ± 86	912 ± 66
Glutamate	3176 ± 339	3670 ± 441	4716 ± 262	3692 ± 351	5168 ± 436†‡
Serine	731 ± 58	717 ± 50	754 ± 74	642 ± 52	689 ± 37
Asparagine	102 ± 7	95 ± 7	102 ± 5	85 ± 4	96 ± 7
Glycine	2862 ± 163	2824 ± 291	2509 ± 162	2384 ± 195	2262 ± 97
Glutamine	4606 ± 207	5036 ± 421	6306 ± 345	4830 ± 340§	5359 ± 432
Histidine	569 ± 21	601 ± 35	589 ± 19	535 ± 25	560 ± 87
Threonine	316 ± 12	315 ± 19	304 ± 24	168 ± 11†§	196 ± 16†§
Alanine	3073 ± 216	4499 ± 659	3995 ± 296	3460 ± 376	2931 ± 281†
Proline	3362 ± 210	3533 ± 341	3348 ± 160	3093 ± 261	2898 ± 320
Tyrosine	563 ± 31	547 ± 56	457 ± 26	444 ± 27	430 ± 12
Valine	214 ± 7	168 ± 10*	166 ± 13	630 ± 34†§	664 ± 35†§
Methionine	37 ± 3	38 ± 5	35 ± 2	37 ± 2	42 ± 2
Ornithine	363 ± 35	300 ± 15	369 ± 25	321 ± 23	390 ± 37
Isoleucine	130 ± 4	105 ± 8*	107 ± 9	256 ± 15†§	278 ± 14†§
Leucine	231 ± 7	174 ± 12*	178 ± 14	473 ± 26†§	512 ± 25†§
Lysine	549 ± 26	564 ± 54	495 ± 44	405 ± 60	379 ± 24†
Phenylalanine	556 ± 63	410 ± 43	423 ± 41	471 ± 44	531 ± 29
Derived values					
BCAA	575 ± 17	448 ± 29*	451 ± 36	1360 ± 75†§	1456 ± 72†§
Total	22,140 ± 617	24,596 ± 666*	26,026 ± 807†	22,876 ± 629	24,300 ± 920
Total-GVLIPT	15,840 ± 743	18,156 ± 848	18,389 ± 773	15,772 ± 747	16,525 ± 993

Mean ± SE in nmol/g of liver. BCAA, branched-chain amino acids; Gln, glutamine; Total-GVLIPT, the sum of amino acid concentrations without glutamine, BCAA (valine, leucine, isoleucine), phenylalanine, and tyrosine.

*The difference between saline-infused control and septic rats (*t*-test, *p* < .05). The effect of Gln, BCAA, or Gln + BCAA infusion in septic rats (Bonferroni test): †*p* < .05, Gln or BCAA or Gln + BCAA vs saline; §*p* < .05, BCAA or Gln + BCAA vs Gln; ‡*p* < .05, Gln + BCAA vs BCAA.

num, there was a decrease in serine, asparagine, threonine, and lysine (Tables II and IV). In addition, a significant decrease in glutamine, glycine, and ornithine

was found in skeletal muscle, and a decrease in methionine and all 3 BCAA in the jejunum. The main response to turpentine oil treatment in the liver was

TABLE IV
Amino acid concentrations in jejunum

	Control saline infusion (n = 6)	Sepsis			
		Saline infusion (n = 7)	Amino acid infusion		
			Gln (n = 7)	BCAA (n = 7)	Gln + BCAA (n = 7)
Aspartate	1043 ± 46	979 ± 59	1033 ± 42	989 ± 35	951 ± 44
Glutamate	3235 ± 186	2914 ± 185	2967 ± 80	3128 ± 86	3298 ± 89
Serine	967 ± 92	584 ± 56*	570 ± 27	552 ± 63	472 ± 32
Asparagine	367 ± 48	207 ± 42*	203 ± 19	215 ± 38	192 ± 19
Glycine	1792 ± 114	1427 ± 187	1247 ± 75	1275 ± 133	1114 ± 59
Glutamine	962 ± 103	812 ± 116	1087 ± 64	808 ± 47	1000 ± 66
Histidine	202 ± 27	133 ± 23	117 ± 9	135 ± 25	115 ± 13
Threonine	639 ± 65	242 ± 48*	273 ± 42	260 ± 45	138 ± 15
Alanine	2747 ± 239	2495 ± 279	2618 ± 134	2295 ± 173	2209 ± 160
Proline	2080 ± 79	1862 ± 127	1928 ± 47	1784 ± 60	1575 ± 46†
Tyrosine	505 ± 39	405 ± 44	328 ± 18	381 ± 31	321 ± 18
Valine	478 ± 62	262 ± 36*	243 ± 18	887 ± 84†‡	705 ± 28†‡
Methionine	178 ± 25	83 ± 10*	74 ± 6	92 ± 14	75 ± 10
Ornithine	64 ± 8	49 ± 7	44 ± 3	45 ± 8	43 ± 7
Isoleucine	326 ± 47	171 ± 24*	156 ± 14	434 ± 46†‡	329 ± 15†‡
Leucine	491 ± 54	278 ± 42*	260 ± 25	787 ± 86†‡	596 ± 28†‡
Lysine	520 ± 66	323 ± 37*	268 ± 40	339 ± 48	264 ± 30
Phenylalanine	1277 ± 84	918 ± 74*	939 ± 60	1015 ± 42	871 ± 57
Derived values					
BCAA	1296 ± 134	712 ± 103*	659 ± 57	2107 ± 213†‡	1630 ± 63†‡
Total	9304 ± 633	7089 ± 681*	7132 ± 207	8317 ± 282	7125 ± 341
Total-GVLIPT	5265 ± 335	4241 ± 383	4119 ± 174	4007 ± 238	3303 ± 206

Mean ± SE in nmol/g of jejunum. BCAA, branched-chain amino acids; Gln, glutamine; Total-GVLIPT, the sum of amino acid concentrations without glutamine, BCAA (valine, leucine, isoleucine), phenylalanine, and tyrosine.

*The difference between saline-infused control and septic rats (*t*-test, *p* < .05). The effect of Gln, BCAA, or Gln + BCAA infusion in septic rats (Bonferroni test): †*p* < .05, Gln or BCAA or Gln + BCAA vs saline; ‡*p* < .05, BCAA or Gln + BCAA vs Gln.

TABLE V
Fractional rate of protein synthesis (%/d) in gastrocnemius muscle, liver, and jejunum

	Control saline infusion (n = 6)	Sepsis			
		Saline infusion (n = 7)	Amino acid infusion		
			Gln (n = 7)	BCAA (n = 7)	Gln + BCAA (n = 7)
Muscle	14.4 ± 1.1	11.3 ± 0.8*	13.7 ± 1.8	10.9 ± 0.7	12.7 ± 0.8
Liver	84.5 ± 6.4	58.5 ± 5.3*	85.2 ± 8.7†	75.2 ± 8.1	87.4 ± 2.7†
Jejunum	114.5 ± 5.7	90.3 ± 7.2*	100.2 ± 11.8	97.7 ± 7.1	86.1 ± 15.9

Mean ± SE.

*The difference between saline-infused control and septic rats (*t*-test, *p* < .05). The effect of Gln, BCAA, or Gln + BCAA infusion in septic rats (Bonferroni test): †*p* < .05, Gln or BCAA or Gln + BCAA *vs* saline.

the decrease in aspartate and BCAA (Table III). The main findings derived from infusions of tested solutions to turpentine-treated animals included an increase in glutamine concentration in blood plasma and skeletal muscle after glutamine infusion and an increase in BCAA in blood plasma and tissues after BCAA infusion.

The data demonstrating the changes in protein synthesis are given in Table V. Turpentine oil treatment induced significant decrease in protein synthesis in all studied tissues. Glutamine or glutamine + BCAA infusion enhanced protein synthesis rate to control values in hepatic tissue. We did not find a significant effect of glutamine, BCAA, or simultaneous infusion of these substances on protein synthesis in skeletal muscle and in jejunum.

DISCUSSION

Subcutaneous injection of turpentine induces necrosis surrounded by an infiltrate of inflammatory cells without detectable injury to other tissues. There is general agreement that this model produces many of the features of the acute-phase response to injury.²⁰ The marked decrease in protein synthesis in muscle, liver, and jejunum indicates that turpentine injection induces severe metabolic disturbances in the whole body, particularly the development of muscle wasting and decreased production of a wide spectrum of acute-phase proteins involved in response of the body against the injury.

As stimulation of protein synthesis in hepatic tissue was observed in rats that were pair-fed or fed *ad libitum* after turpentine treatment,²⁰ we suppose that the lack of food may explain the impairment of protein synthesis in hepatic tissue observed in our study. It may be suggested that starvation causes the delay in onset of increased hepatic synthesis of acute-phase proteins (eg, C-reactive protein, α_2 -macroglobulin, and fibrinogen), which is stimulated by humoral factors produced by immune cells (eg, by cytokines). This suggestion indicates the importance of early nutrition management in treatment of sepsis.

The most important alteration in amino acid concentrations induced by turpentine is probably decreased concentration of glutamine in blood and skeletal muscle. The decrease is related to increased use of glutamine in several tissues, particularly in immune cells, kidneys, and liver, that exceeds activated synthesis of glutamine in skeletal muscle. Lack of glutamine is

considered an important factor in the development of cachexia, impaired wound healing, and immunodeficiency in inflammatory injury.²¹ Also important practically is the finding of increased concentration of glutamate in blood probably caused by incomplete oxidation of glutamine. Enhanced glutamate levels in the portal vein after turpentine treatment indicate that the main source of glutamic acid is the gut.²² This observation may be an argument against suggestions to increase the intake of glutamic acid in stress illness.^{23,24}

In inflammatory illness, BCAA are used as the principal energy substrate and precursor for synthesis of alanine and glutamine in skeletal muscle. Enhanced proteolysis and BCAA oxidation in skeletal muscle have been demonstrated in different types of stress illness both in animals and humans.^{25–28} The finding in the present study of unchanged levels of BCAA in skeletal muscle and blood indicates that the demands of the body for BCAA are saturated by activated breakdown of muscle protein.

The cause of decreased concentrations of BCAA in liver and jejunum is not clear. It may be related to enhanced catabolism, decreased uptake, or increased release of BCAA to the bloodstream. The suggestion of increased release is supported by observation of increased BCAA concentration in effluent of the perfused hepatic tissue of endotoxemic or TNF- α -treated rats.²⁹ Decreased uptake or enhanced release of BCAA by visceral tissues may prevent the decrease of BCAA in blood plasma and the preferential use of BCAA by skeletal muscle for energy and glutamine and alanine synthesis. However, the lack of BCAA may participate in impaired protein synthesis in these tissues. We suppose that these findings and speculations may be a further rational argument for recommendation to enhance exogenous delivery of BCAA in inflammatory illness.

Because energy content of infused amino acid solutions was about 1.5 kJ and energy output of the laboratory rat is approximately 800 kJ/kg, <0.8% of daily energy requirements was provided *via* infusion. Therefore, the responses induced by infusion of glutamine or BCAA in our study should be related to the role of these amino acids in intermediary metabolism.

Although in some studies glutamine supplementation failed to affect muscle protein kinetics in critically ill patients,³⁰ in most studies the favorable effect of amino acid solutions enriched by glutamine on protein

balance has been demonstrated.^{5,9-11} In our experiment, glutamine infusion to turpentine-treated animals induced significant increase in protein synthesis in liver. This finding indicates that increased delivery of glutamine may favorably affect the response of hepatic tissue to inflammatory stimuli. In our recent study, increased oxidation of branched-chain keto acids was observed in isolated rat liver perfused by glutamine-deficient medium.³¹ Therefore, it also might be suggested that the glutamine supply might decrease BCAA oxidation and enhance availability of these essential amino acids for needs of extrahepatic tissues.¹² Also clinically important is the enhanced glutamine concentration in skeletal muscle, which may favorably affect BCAA oxidation and proteolysis in this tissue.¹⁴

BCAA infusion did not significantly improve protein synthesis in turpentine-treated animals, although the deficiency of BCAA has been observed in liver and jejunum and increased concentrations of BCAA were found after BCAA or BCAA + glutamine infusion in all examined tissues. Increased concentrations of BCAA in tissues after their infusion indicate that there is no impairment in transport of BCAA across the cell membrane. A possible explanation of the failure of BCAA to improve protein synthesis in inflammatory illness would be that BCAA metabolism is directed towards catabolic reactions. These may saturate energy requirements and inhibition of anabolic reactions.

The main focus of the present study was to estimate the possibility of a synergistic effect of simultaneous infusion of glutamine and BCAA on protein metabolism in septic injury. The hypothesis was based on (1) the well-known relationships between BCAA catabolism and Gln synthesis; (2) characteristic changes in BCAA and glutamine metabolism in severe illness (ie, increased glutamine use and increased BCAA catabolism associated with enhanced glutamine production); and (3) our recent finding that glutamine administration significantly decreases leucine oxidation.¹⁴ An additional argument supporting our hypothesis may be the deficiency of glutamine in skeletal muscle and of BCAA in visceral tissues observed in this study. Unfortunately, the data evaluating the effect of tested solutions on protein synthesis did not demonstrate a significant difference between separate and simultaneous infusions of BCAA and glutamine.

In conclusion, the results indicate that the response of the tissues to parenteral administration of dietary supplements, particularly glutamine, is not markedly inhibited and that increased delivery of glutamine may favorably affect the response of hepatic tissue to inflammatory stimuli. The study did not provide evidence supporting the hypothesis of a synergistic effect of simultaneous infusion of glutamine and BCAA on protein synthesis in inflammatory injury. However, we suppose that some additional studies using other models of inflammatory illness and evaluating some additional parameters, particularly the effect on proteolysis, should be performed before our hypothesis can be rejected.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by Research Project MSM0021620820. We are grateful for technical support from I. Altmannova, H. Buzkova, L. Kriesfalusyova, D. Jezková, and R. Rysava. Many thanks to Dr Hana Skalska for help with statistical analysis and to Jan Tilser for English revision.

REFERENCES

1. Harper AE, Miller RH, Block KP. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1984;4:409-454.
2. James JH. Branched chain amino acids in hepatic encephalopathy. *Am J Surg.* 2002;183:424-429.
3. Freund HR, Hanani M. The metabolic role of branched-chain amino acids. *Nutrition.* 2002;18:287-288.
4. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 2000;130:2413-2419.
5. De Bandt JP, Cynober LA. Amino acids with anabolic properties. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1998;1:263-272.
6. Laviano A, Muscaritoli M, Cascino A, et al. Branched-chain amino acids: the best compromise to achieve anabolism? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8:408-414.
7. Cai JW, Hughes CS, Shen JW, Subjeck JR. Induction of heat-shock proteins by glutamine: the "feeding effect." *FEBS Lett.* 1991;288:229-232.
8. Wischmeyer PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition.* 2002;18:225-228.
9. Stehle P, Zander J, Mertes N, et al. Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet.* 1989;i:231-233.
10. Wernerman J, Hammarqvist F, Vinnars E. α -Ketoglutarate and postoperative muscle catabolism. *Lancet.* 1990;335:701-703.
11. Newsholme E, Hardy G. Supplementation of diets with nutritional pharmaceuticals. *Nutrition.* 1997;13:837-839.
12. Holecek M. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition.* 2002;18:130-133.
13. Darmaun D, Dechelotte P. Role of leucine as a precursor of glutamine alpha-amino nitrogen in vivo in humans. *Am J Physiol.* 1991;260:E326-E329.
14. Holecek M, Skopec F, Skalska H, Sprongl L. Effect of alanylglutamine on leucine and protein metabolism in endotoxemic rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24:215-222.
15. Garlick PJ, McNurlan MA, Preedy VR. A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissue by injection of [³H]phenylalanine. *Biochem J.* 1980;192:719-723.
16. Holecek M, Sprongl L, Skopec F, Andrys C, Pecka M. Leucine metabolism in TNF- α and endotoxin-treated rats: contribution of hepatic tissue. *Am J Physiol.* 1997;273:E1052-E1058.
17. McNurlan MA, Tomkins AM, Garlick PJ. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. *Biochem J.* 1979;178:373-379.
18. Welle S. Methods for studying protein metabolism in humans. In: Welle S, ed. *Human Protein Metabolism.* New York, NY: Springer-Verlag; 1999:29-71.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.
20. Wusteman M, Wight DGD, Elia M. Protein metabolism after injury with turpentine: a rat model for clinical trauma. *Am J Physiol.* 1990;259:E763-E769.
21. Biolo G, Zorat F, Antonione R, Ciochi B. Muscle glutamine depletion in the intensive care unit. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37:2169-2179.
22. Saadane A, Delautier D, Lestriez V, Feldmann G, Lardoux B, Bleiberg-Daniek F. Down-regulation of liver RNA breakdown by turpentine administration in the starved rat: autophagy and relevant factors. *Inflamm Res.* 1999;48:210-217.
23. Hasebe M, Suzuki H, Mori E, Furukawa J, Kobayashi K, Ueda Y. Glutamate in enteral nutrition: can glutamate replace glutamine in supplementation to enteral nutrition in burned rats? *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1999;23(5 suppl):S78-S82.
24. Rutten EP, Engelen MP, Schols AM, Deutz NE. Skeletal muscle

- glutamate metabolism in health and disease: state of the art. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2005;8:41–51.
25. Holecek M. Leucine metabolism in fasted and TNF treated rats. *Clin Nutr*. 1996;15:91–93.
 26. Kadlcikova J, Holecek M, Safranek R, Tilser I, Kessler BM. Effects of proteasome inhibitors MG132, ZL₃VS and AdaAhx₃L₃VS on protein metabolism in septic rats. *Int J Exp Pathol*. 2004;85:365–371.
 27. Baracos VE, Mackenzie ML. Investigations of branched-chain amino acids and their metabolites in animal models of cancer. *J Nutr*. 2006;136(1 suppl):237S–242S.
 28. Rennie MJ, Bohe J, Smith K, Wackerhage H, Greenhaff P. Branched-chain amino acids as fuels and anabolic signals in human muscle. *J Nutr*. 2006;136(1 suppl):264S–268S.
 29. Holecek M, Sprongl L, Tichy M, Pecka M. Leucine metabolism in rat liver after a bolus injection of endotoxin. *Metabolism*. 1998;47:681–685.
 30. Gore DC, Wolfe RR. Glutamine supplementation fails to affect muscle protein kinetics in critically ill patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2002;26:342–349.
 31. Holecek M, Rysava R, Safranek R, Kadlcikova J, Sprongl L. Acute effects of decreased glutamine supply on protein and amino acid metabolism in hepatic tissue: a study using isolated perfused rat liver. *Metabolism*. 2003;52:1062–1067.

10.2.1.7 Safránek R, Holecek M, Sispera L, Muthný T: Aspects of protein and amino acid metabolism in a model of severe glutamine deficiency in sepsis. *Ann Nutr Metab* 2006;50(4):361-7

Aspects of Protein and Amino Acid Metabolism in a Model of Severe Glutamine Deficiency in Sepsis

Roman Šafránek^a Milan Holeček^a Luděk Šišpera^a Tomáš Muthný^b

^aDepartment of Physiology, Faculty of Medicine, and ^bDepartment of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

Key Words

Glutamine · Sepsis · Methionine sulfoximine · Skeletal muscle · Protein metabolism · Growth hormone

Abstract

Background/Aims: Growth hormone (GH) could have the potential to improve protein metabolism in sepsis but glutamine deficiency has been reported after GH treatment. The aim was to investigate the effects of glutamine deficiency in sepsis with and without GH treatment on protein and amino acid metabolism. **Methods:** Cecal ligation and puncture (CLP) was used as a model of sepsis. Serious glutamine deficiency was induced by administration of glutamine synthetase inhibitor, methionine sulfoximine (MSO). Young Wistar rats were divided into 5 groups: control; CLP; CLP+MSO; CLP+GH, and CLP+MSO+GH. Parameters of protein metabolism were measured on incubated soleus and extensor digitorum longus muscles: [¹⁻¹⁴C]leucine was used to estimate protein synthesis and leucine oxidation, tyrosine release was used to evaluate protein breakdown. Amino acid concentrations in plasma, skeletal muscle and incubation media were measured by HPLC. **Results/Conclusions:** A reduced muscle glutamine concentration after MSO treatment is not associated with changes in the rates of protein synthesis or breakdown. MSO treatment decreased glutamine release from

skeletal muscle and plasma glutamine concentration. Severe glutamine deficiency in GH-treated septic rats resulted in increased release of branched-chain amino acids from skeletal muscle.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Introduction

Glutamine is a conditionally essential amino acid that has many metabolic functions. It plays an important role in the transfer of nitrogen between tissues and serves as an energy source for rapidly dividing cells, such as enterocytes and cells of the immune system [1]. In sepsis large amounts of glutamine released from skeletal muscle are used by other tissues and there is a fall in skeletal muscle and plasma glutamine levels [2–4]. Glutamine supplementation in sepsis has been shown to increase [5] or have no effect [3] on protein synthesis in skeletal muscle in rats. Adverse effects of glutamine supplementation on protein metabolism have never been observed even with very high doses of glutamine.

Growth hormone (GH) has potent anabolic actions in normal and also in septic subjects due to stimulation of protein synthesis. However, a number of studies failed to prove any positive effects of GH treatment. This discrep-

ancy might be explained by resistance to GH that is induced in sepsis by several mechanisms that have recently been identified [6–8]. Changes in glutamine metabolism induced by GH might also play a role. GH administration in septic states was shown to deepen glutamine deficiency by decreasing glutamine production [9]. Glutamine deficiency was also reported in a recent study in which critically ill patients were treated with GH [10]. In that study GH treatment had adverse effects on mortality and morbidity and prolonged the length of hospital stay.

The aim of the present study was to evaluate the effects of severe glutamine deficiency on amino acid and protein metabolism in sepsis with and without GH administration. For this reason we used L-methionine sulfoximine (MSO), a glutamine synthetase inhibitor, to develop severe glutamine deficiency [11]. Cecum ligation and puncture (CLP), a frequent and clinically relevant model of the proteocatabolic state, was used as a model of sepsis.

Materials and Methods

L-[1-¹⁴C]Leucine was purchased from ICN Biomedicals (Costa Mesa, Calif., USA). L-Methionine sulfoximine, amino acids, cycloheximide, Folin-Ciocalteu's phenol reagent and albumin were purchased from Sigma Chemicals (St Louis, Mo., USA), hydroxide of hyamine from Packard Instruments (Meriden, Conn., USA), Aminoplasmal 15 from B. Braun Medicals (Melsungen, Germany), osmotic pumps from Alzet Osmotic Pumps (Cupertino, Calif., USA). Other chemicals were purchased from Sigma Chemicals, Waters (Milford, Mass., USA), and Lachema (Brno, Czech Republic).

Animals

Female Wistar rats (body weight 40–60 g), obtained from BioTest (Konarovice, Czech Republic), were used in this study. The rats were given free access to standard laboratory chow and water. All procedures involving animals were approved by Ethical Committee of the Charles University.

Induction of Sepsis, Muscle Incubation

Sepsis was induced by CLP under ether anesthesia. In brief, 80% of the cecum was ligated through a 1.5-cm abdominal midline incision. One through-and-through puncture was made using an 18-gauge needle, and a small amount of stool was expelled from the puncture to ensure leakage of the intestinal content. After repositioning of the bowel, the abdomen was closed in two layers, and 10 ml of sterile physiologic saline solution per 100 g of body weight was administered subcutaneously on the back for hydration.

Eighteen hours after CLP, blood was withdrawn from the aorta, soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles of both legs were dissected under anesthesia with pentobarbital (6 mg/100 g body weight, intraperitoneally) as described in detail by Maizels et al. [12]. Isolated muscles were fixed to stainless steel clips to provide slight tension and immediately transferred to

2.5 ml of modified Krebs-Henseleit bicarbonate buffer with 6 mM glucose and 2 mU/ml insulin. Medium was gassed with O₂/CO₂ (19:1). Muscles were preincubated for 30 min in a thermostatically controlled bath (37°C) with a shaking device (70 cycles/min). After preincubation, muscles were quickly rinsed in 0.9% NaCl, blotted and transferred to a second set of vials containing fresh media identical in composition and volume.

Protein and Amino Acid Metabolism Measurement

Protein synthesis and leucine oxidation were measured after 1-hour incubation in media with amino acids in a total concentration of 2.8 mM (Aminoplasmal 15 with added glutamine and tyrosine). [1-¹⁴C]Leucine (0.6 μCi/ml) was present in incubation medium only. At the end of the incubation, 0.4 ml of hydroxide of hyamine was added into the hanging well to absorb carbon dioxide and the reaction was stopped by the addition of 35% (v/v) perchloric acid solution (0.2 ml) into the incubation medium. Muscles were removed from the incubation flasks, quickly rinsed in cold 0.9% NaCl and blotted, and then dropped into liquid nitrogen and pulverized. Muscles were further homogenized and proteins precipitated in 6% (v/v) HClO₄. L-[1-¹⁴C]Leucine incorporation into proteins was estimated after hydrolysis of proteins in 2 M NaOH. Protein synthesis was calculated using leucine specific activity in incubation medium and expressed as nanomoles of incorporated leucine per milligram protein per hour. The amount of ¹⁴C released from L-[1-¹⁴C]leucine in the form of ¹⁴CO₂ was used to calculate the oxidation of leucine.

Total protein breakdown was estimated during a 2-hour incubation and expressed as the rate of tyrosine released into the medium. To prevent reincorporation of amino acids released during proteolysis, 0.5 mM cycloheximide was present in the medium.

Amino acid concentrations in deproteinized samples of blood plasma, tibialis muscle and incubation medium were determined by high-performance liquid chromatography (Waters) after pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate [13, 14]. Protein content was measured according to Lowry et al. [15]. The radioactivity of the samples was measured with the liquid scintillation radioactivity counter LS 6000 (Beckman Instruments, Fullerton, Calif., USA).

Experimental Design

Animals were divided into 5 groups: (1) control, sham-operated animals (n = 11 at the start of the experiment); (2) CLP (n = 15); (3) CLP+GH, (n = 14); (4) CLP+MSO (n = 14), and (5) CLP+GH+MSO (n = 18). Sham-operated animals underwent the same procedures as CLP animals except for ligation and puncture of the cecum and no MSO was administered. GH and L-methionine sulfoximine were administered at the end of surgery. The total dose of GH was 1.5 IU/50 g of body weight/24 h; 1 IU was administered subcutaneously, 0.5 IU was administered using an osmotic pump. MSO was dissolved in physiologic saline and administered by an intraperitoneal injection at a dose 5 mg/100 g of body weight.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean ± SE. ANOVA followed by Tukey-Kramer test was used for analysis of the data. Differences were considered significant at p < 0.05.

Table 1. Parameters of experimental animals

	Control	CLP	CLP+GH	CLP+MSO	CLP+GH+MSO
Hematocrit, %	0.37 ± 0.005	0.29 ± 0.03*	0.33 ± 0.02	0.23 ± 0.013*,#	0.28 ± 0.02*
Hemoglobin, g/l	111 ± 1.0	90 ± 7	102 ± 5	73 ± 4*,#	89 ± 7*
Platelets, × 10 ⁹ /l	1,040 ± 40	360 ± 40*	160 ± 30*	330 ± 50*	340 ± 70*
Leukocytes, × 10 ⁹ /l	2.1 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.11	1.0 ± 0.10	1.5 ± 0.3
Spleen, dry/wet wt-100	22.6 ± 0.6	21.0 ± 0.2*	21.0 ± 0.2*	21.1 ± 0.15*	21.4 ± 0.2*
Kidney, dry/wet wt-100	22.7 ± 0.3	21.1 ± 0.2*	21.5 ± 0.2	21.0 ± 0.3*	21.1 ± 0.4*
Mortality, %	0	20	29	14	33
Number of animals ^a	11/11	15/12	14/10	14/12	18/12

ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple-comparison test: * different from control; # different from CLP+GH group. $p < 0.05$ was considered significant. CLP = Cecal ligation and puncture; CLP+GH = cecal ligation and puncture with growth hormone; CLP+MSO = cecal ligation and puncture with methionine sulfoximine; CLP+GH+MSO = cecal ligation and puncture with growth hormone and methionine sulfoximine.

^a Number of animals at the start of the experiment/number of animals after 18 h.

Table 2. Amino acid concentrations (μmol/g muscle tissue; mean ± SE) in the tibialis muscle

	Control	CLP	CLP + GH	CLP + MSO	CLP + GH + MSO
Number of animals	11	12	10	12	12
Alanine	1.6 ± 0.09	2.2 ± 0.17	2.3 ± 0.16	2.5 ± 0.2*	2.4 ± 0.19*
Asparagine	0.17 ± 0.013	0.18 ± 0.015	0.17 ± 0.008	0.15 ± 0.012	0.17 ± 0.013
Aspartate	0.32 ± 0.04	0.30 ± 0.06	0.26 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.33 ± 0.05
Glutamate	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.16
Glutamine	2.6 ± 0.2	2.0 ± 0.2*	2.0 ± 0.06*	0.91 ± 0.04*, +	0.94 ± 0.06*, +
Glycine	4.4 ± 0.3	3.3 ± 0.2*	3.2 ± 0.2*	3.6 ± 0.2	3.8 ± 0.2
Histidine	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.007	0.33 ± 0.03	0.29 ± 0.016
Isoleucine	0.12 ± 0.009	0.18 ± 0.018	0.17 ± 0.010	0.21 ± 0.015*	0.22 ± 0.018*
Leucine	0.14 ± 0.01	0.26 ± 0.03*	0.25 ± 0.02	0.31 ± 0.03*	0.31 ± 0.03*
Lysine	1.57 ± 0.17	2.4 ± 0.3*	1.8 ± 0.17	2.7 ± 0.18*,#	2.6 ± 0.14*,#
Methionine	0.063 ± 0.005	0.079 ± 0.010	0.080 ± 0.004	0.072 ± 0.005	0.078 ± 0.004
Phenylalanine	0.094 ± 0.008	0.16 ± 0.017*	0.16 ± 0.009*	0.15 ± 0.011*	0.15 ± 0.009*
Proline	0.66 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.67 ± 0.03	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.03
Serine	0.82 ± 0.09	0.59 ± 0.05*	0.56 ± 0.03*	0.52 ± 0.03*	0.55 ± 0.03*
Tyrosine	0.10 ± 0.007	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.013
Valine	0.21 ± 0.014	0.31 ± 0.03	0.30 ± 0.02	0.39 ± 0.04*	0.37 ± 0.04*
Amino acids total	15.2 ± 1.0	14.8 ± 1.1	14.0 ± 0.5	14.9 ± 0.7	14.8 ± 0.7

ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple-comparison test: * different from control; + different from CLP; # different from CLP+GH group. $p < 0.05$ was considered significant. For abbreviations, see table 1.

Results

The parameters of experimental animals are summarized in table 1. We observed a decrease in platelets, hematocrit, and dry-to-wet weight ratio of the spleen and kidney in septic animals. These results indicate that our sepsis model is most likely accompanied by disseminated

intravascular coagulation, hemodilution and a generalized edematous state. Decreased hematocrit and hemoglobin concentrations in MSO-treated animals imply that MSO worsens the septic state, but taken together with mortality, which was lowest in this group, prolonged survival in the MSO-treated group is a probable explanation.

Table 3. Amino acid concentrations ($\mu\text{mol/l}$; mean \pm SE) in plasma

	Control	CLP	CLP+GH	CLP+MSO	CLP+GH+MSO
Number of animals	11	12	10	12	12
α -Aminobutyric acid	148 \pm 22	75 \pm 12*	60 \pm 09*	83 \pm 08*	91 \pm 13*
Alanine	272 \pm 19	213 \pm 30	271 \pm 60	239 \pm 37	285 \pm 45
Arginine	148 \pm 10	80 \pm 6*	91 \pm 7*	73 \pm 10*	80 \pm 7*
Citruline	126 \pm 9	109 \pm 11	92 \pm 10	105 \pm 18	91 \pm 11
Glutamate	215 \pm 16	178 \pm 14	186 \pm 19	85 \pm 6*, +	99 \pm 8*, +
Glutamine	483 \pm 19	465 \pm 24	461 \pm 22	201 \pm 14*, +, #	203 \pm 20*, +, #
Glycine	415 \pm 28	256 \pm 22*	268 \pm 27*	283 \pm 24*	320 \pm 22
Histidine	50 \pm 3	93 \pm 8*	88 \pm 8*	109 \pm 7*	113 \pm 9*
Isoleucine	102 \pm 8	96 \pm 10	96 \pm 13	124 \pm 12	127 \pm 16
Leucine	159 \pm 17	170 \pm 20	163 \pm 24	212 \pm 26	216 \pm 31
Lysine	340 \pm 17	232 \pm 31	276 \pm 51	223 \pm 28	255 \pm 27
Methionine	55 \pm 36	30 \pm 2*	34 \pm 2*	27 \pm 1.6*	33 \pm 2*
Ornithine	70 \pm 13	70 \pm 8	61 \pm 10	69 \pm 9	56 \pm 8
Phenylalanine	79 \pm 5	87 \pm 6	91 \pm 7	90 \pm 3	89 \pm 6
Proline	136 \pm 12	68 \pm 6*	77 \pm 7*	55 \pm 3*	65 \pm 6*
Serine	249 \pm 16	157 \pm 11*	159 \pm 7*	145 \pm 14*	148 \pm 13*
Taurine	198 \pm 23	266 \pm 34	306 \pm 72	281 \pm 39	303 \pm 48
Threonine	251 \pm 19	171 \pm 17*	172 \pm 11*	159 \pm 12*	186 \pm 15*
Tyrosine	64 \pm 6	67 \pm 10	72 \pm 13	61 \pm 8	71 \pm 10
Valine	204 \pm 17	203 \pm 24	200 \pm 28	263 \pm 28	254 \pm 36
Amino acids total	3,631 \pm 107	3,020 \pm 208	3,152 \pm 327	2,810 \pm 212	3,000 \pm 269

ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple-comparison test: * different from control; + different from CLP; # different from CLP+GH group. $p < 0.05$ was considered significant. For abbreviations, see table 1.

Table 4. Amino acids (nmol/g wet weight/h; mean \pm SE) released from incubated extensor digitorum longus muscles into the incubation medium

	Control	CLP	CLP+GH	CLP+MSO	CLP+GH+MSO
Number of samples	11	12	10	12	12
Alanine	1,337 \pm 178	1,207 \pm 105	1,056 \pm 47	1,725 \pm 111*, #	1,791 \pm 65*, +, #
Glutamate	159 \pm 22	155 \pm 13	192 \pm 34	179 \pm 32	151 \pm 11
Glutamine	1,410 \pm 70	1,420 \pm 70	1,642 \pm 74*, +	421 \pm 19*, +, #	487 \pm 19*, +, #
Glycine	923 \pm 43	1,011 \pm 47	1,036 \pm 71	1,031 \pm 73	1,073 \pm 52
Isoleucine	196 \pm 12	279 \pm 27*	250 \pm 11	297 \pm 18*	348 \pm 14*, #
Leucine	353 \pm 22	472 \pm 42*	407 \pm 13	495 \pm 28*	585 \pm 22*, +, #
Lysine	524 \pm 27	678 \pm 36*	679 \pm 23*	678 \pm 47*	733 \pm 25*
Methionine	147 \pm 12	207 \pm 9*	206 \pm 5*	208 \pm 10*	241 \pm 8*
Phenylalanine	215 \pm 16	297 \pm 12*	290 \pm 7*	297 \pm 12*	333 \pm 9*
Proline	319 \pm 21	398 \pm 23*	406 \pm 12*	387 \pm 20	419 \pm 12*
Serine	481 \pm 27	572 \pm 34	555 \pm 28	551 \pm 28	583 \pm 19
Tyrosine	180 \pm 13	254 \pm 11*	245 \pm 5*	252 \pm 10*	280 \pm 7*
Valine	281 \pm 16	370 \pm 28*	329 \pm 9	402 \pm 21*	462 \pm 15*, +, #
Amino acids total	6,525 \pm 371	7,321 \pm 363	7,291 \pm 227	6,922 \pm 356	7,486 \pm 190

ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple-comparison test: * different from control; + different from CLP; # different from CLP+GH group. $p < 0.05$ was considered significant. For abbreviations, see table 1.

Table 2 shows that the skeletal muscle glutamine concentration decreased by 23% after CLP and by 65% after CLP with MSO administration. MSO selectively decreased the concentration of glutamine but had no influence on the concentrations of other amino acids. Except for glutamine, CLP decreased the concentrations of glycine and serine and increased the levels of leucine, lysine, and phenylalanine. Compared to the control, in both groups that received MSO the levels of alanine, isoleucine and valine increased.

In plasma, the glutamine and glutamate concentrations decreased significantly in the MSO-treated groups (table 3). CLP induced changes in plasma amino acid concentrations that are observed in sepsis: the levels of arginine, glycine, methionine, proline, serine, threonine, and α -aminobutyric acid decreased, and the level of histidine increased.

The amino acids released from the incubated EDL muscle are shown in table 4. Sepsis increased the release of branched-chain amino acids (valine, leucine and isoleucine), amino acids that are used as markers of muscle proteolysis (tyrosine, phenylalanine and lysine), and proline and methionine. GH treatment to septic animals significantly increased the release of glutamine. We did not observe changes in other amino acids. After MSO administration we observed a decrease in the release of glutamine, which was accompanied by an increase in alanine release. An interesting finding is that a severe glutamine deficiency, which develops after MSO administration, increased the release of all branched-chain amino acids (i.e. valine, leucine and isoleucine) in GH-treated septic rats.

Figure 1 summarizes the effects of CLP, GH and MSO administration on basic parameters of protein metabolism. We observed no change in protein synthesis; protein breakdown was increased in the EDL muscle in all groups that underwent CLP.

Differences in the rates of protein synthesis and breakdown and different reactions to CLP between the soleus (slow-twitch) muscle and EDL (fast-twitch) muscle reflect the biochemical nature of the muscles. Differences in intracellular regulation of protein metabolism in these types of muscles were also shown by Tiao et al. [16] in the same model.

The oxidation of leucine was increased after CLP in both the EDL and soleus muscles, and after MSO administration leucine oxidation decreased nearly to control levels.

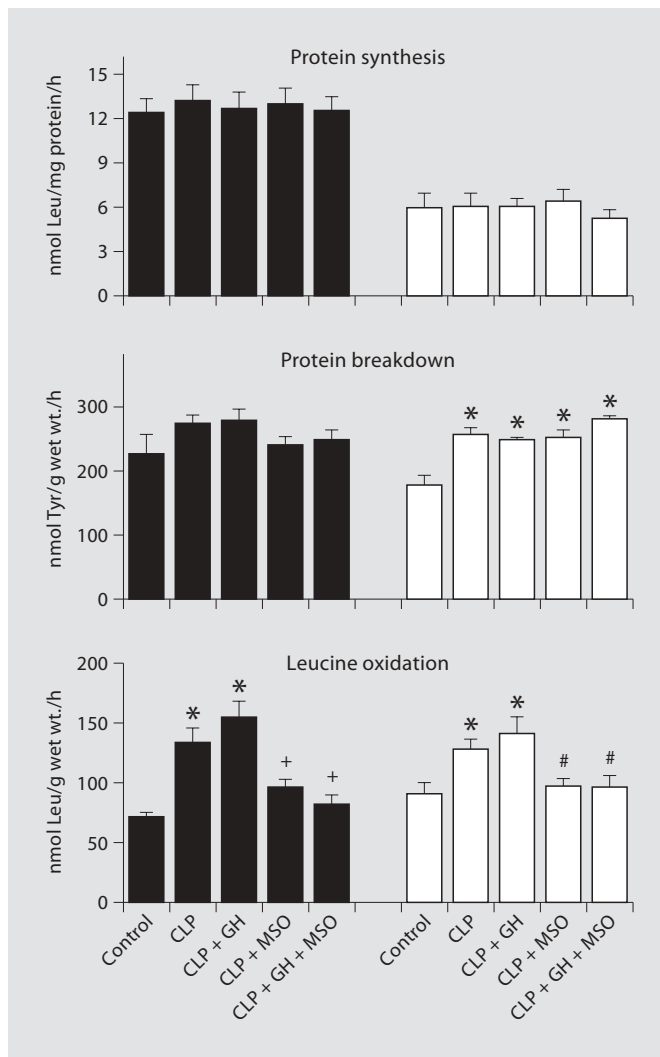


Fig. 1. Effect of CLP, MSO and their combinations on protein synthesis, protein breakdown and leucine oxidation in incubated muscles (mean \pm SE). ■ = Soleus muscle; □ = extensor digitorum longus muscle. ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple-comparison test: * different from control; + different from CLP and CLP+GH; # different from CLP+GH group. $p < 0.05$ was considered significant. For abbreviations, see table 1.

Discussion

We successfully used a glutamine synthetase inhibitor MSO together with CLP to develop a model of severe glutamine deficiency in sepsis. Eighteen hours after CLP and MSO treatment, muscle and plasma glutamine levels fell to 35 and 40%, respectively. In patients with critical illness muscle glutamine levels fall to a similar extent. For example in a study by Gamrin et al. [4], muscle glutamine fell to 30% of control values.

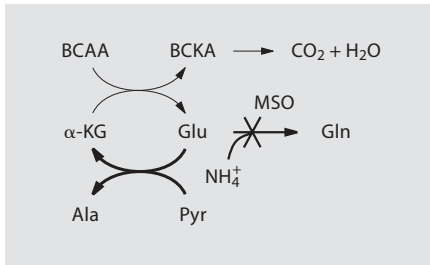


Fig. 2. BCAA = Branched-chain amino acids; BCKA = branched-chain keto acids; MSO = methionine sulfoximine; α-KG = α-ketoglutarate; Glu = glutamate; Gln = glutamine; Ala = alanine; Pyr = pyruvate.

In our experiment, the 65% decrease in muscle glutamine seen in a group that underwent CLP and received MSO was accompanied by a 70–77% decrease in glutamine release from the soleus and EDL muscles and a decrease in plasma glutamine levels. Under these conditions, severe glutamine deficiency may develop in tissues that utilize glutamine in high amounts during sepsis, e.g. in the cells of the immune system, and impair its function. Future experiments will show if this is the pathophysiological mechanism that participates in increasing the number of infectious complications that were observed after the treatment of critically ill patients with high doses of GH [17].

CLP together with inhibition of glutamine synthetase by MSO resulted in muscle glutamine deficiency that had no effect on the rate of protein synthesis and breakdown in the soleus and EDL muscles of septic rats. In the recent reports of Gore and Wolfe [18, 19], glutamine supplementation of critically ill patients failed to affect muscle protein kinetics. These findings oppose the hypothesis that the glutamine concentration regulates the rate of protein synthesis and breakdown. This hypothesis was based on observations of beneficial effects of glutamine on protein metabolism in healthy [20–22] and septic [23, 24] subjects. However, the studies cited used physiologically irrelevant concentrations (5–15 mM) to prove the effects of glutamine on protein metabolism. In the case of septic subjects, the glutamine concentration may correlate with the rate of protein synthesis and breakdown, but glutamine is not a regulatory factor of these parameters.

In MSO-treated animals we observed decreased glutamine and increased alanine concentrations in the skeletal muscle, decreased glutamine and increased alanine release from muscles, along with decreased oxidation of

leucine. The relation between these findings is explained in figure 2. The release of carbon dioxide from α-ketoisocaproate is decreased, and we hypothesize that formation of α-ketoisocaproate from leucine also decreases. Glutamate is not used for the production of glutamine but for the synthesis of alanine, which is then released from the muscle. This is in agreement with a previous experiment from our laboratory in which increased glutamine formation and decreased alanine synthesis were observed in ammonia-infused rats [25].

GH had no effect on protein synthesis and muscle glutamine concentration in our experiment. Similar results (only an insignificant increase in protein synthesis and no change in muscle glutamine concentration after GH treatment) were observed with the CLP model in adult rats receiving parenteral nutrition [2]. Despite the absence of a GH effect on protein synthesis, we did observe an increased release of valine, leucine and isoleucine from the EDL muscle suggesting an unfavorable effect of GH treatment in severe glutamine deficiency on the metabolism of branched-chain amino acids.

In conclusion, the present study shows that a reduced muscle glutamine concentration after MSO treatment is not associated with changes in the rates of protein synthesis or breakdown, but results in decreased glutamine release from skeletal muscle and a decreased plasma glutamine concentration. Severe glutamine deficiency in GH-treated septic rats resulted in an increased release of branched-chain amino acids from the skeletal muscle.

Acknowledgements

This study was funded by grant NB 7611-3 from the Internal Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and by Research Project MSM 0021620820. We are grateful for the technical support of I. Altmannova and R. Rysava.

References

- 1 DeBandt JP, Cynober LA: Amino acids with anabolic properties. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:263–272.
- 2 Jackson NC, Carroll PV, Russell-Jones DL, Sonksen PH, Treacher DF, Umpleby AM: The metabolic consequences of critical illness: acute effects on glutamine and protein metabolism. *Am J Physiol* 1999;276:E163–E170.
- 3 O’Leary MJ, Ferguson CN, Rennie M, Hinds CJ, Coakley JH, Preedy VR: Effect of growth hormone on muscle and liver protein synthesis in septic rats receiving glutamine-enriched parenteral nutrition. *Crit Care Med* 2002;30:1099–1105.
- 4 Gamrin L, Essen P, Forsberg AM, Hultman E, Wernerman J: A descriptive study of skeletal muscle metabolism in critically ill patients: free amino acids, energy-rich phosphates, protein, nucleic acids, fat, water, and electrolytes. *Crit Care Med* 1996;24:575–583.
- 5 Naka S, Saito H, Hashiguchi Y, Lin M, Furukawa S, Inaba T, Fukushima R, Wada N, Muto T: Alanyl-glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in rat protracted bacterial peritonitis model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1996;20:417–423.
- 6 Hong-Brown LQ, Brown CR, Cooney RN, Frost RA, Lang CH: Sepsis-induced muscle growth hormone resistance occurs independently of STAT5 phosphorylation. *Am J Physiol* 2003;285:E63–E72.
- 7 Wang P, Li N, Li JS, Li WQ: The role of endotoxin, TNF- α , and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. *World J Gastroenterol* 2002;8:531–536.
- 8 Lang CH, Hong-Brown L, Frost RA: Cytokine inhibition of JAK-STAT signaling: a new mechanism of growth hormone resistance. *Pediatr Nephrol* 2005;20:306–312.
- 9 Biolo G, Iscra F, Bosutti A, Toigo G, Ciocchi B, Geatti O, Gullo A, Guarneri G: Growth hormone decreases muscle glutamine production and stimulates protein synthesis in hypercatabolic patients. *Am J Physiol* 2000;279:E323–E332.
- 10 Takala J, Ruokonen E, Webster NR, Nielsen MS, Zandstra DF, Vundelinckx G, Hinds CJ: Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *N Engl J Med* 1999;341:785–792.
- 11 Ronzio RA, Meister A: Phosphorylation of methionine sulfoximine by glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968;59:164–170.
- 12 Maizels EZ, Ruderman NB, Goodman MN, Lau D: Effect of acetoacetate on glucose metabolism in the soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat. *Biochem J* 1977;162:557–568.
- 13 Cohen SA, Michaud DP: Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1993;211:279–287.
- 14 Reverter M, Lundh T, Lindberg JE: Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1997;696:1–8.
- 15 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–275.
- 16 Tiao G, Lieberman M, Fischer JE, Hasselgren PO: Intracellular regulation of protein degradation during sepsis is different in fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol* 1997;272:R849–R856.
- 17 Ruokonen E, Takala J: Dangers of growth hormone therapy in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:199–209.
- 18 Gore DC, Wolfe RR: Glutamine supplementation fails to affect muscle protein kinetics in critically ill patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002;26:342–350.
- 19 Gore DC, Wolfe RR: Metabolic response of muscle to alanine, glutamine, and valine supplementation during severe illness. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2003;27:307–314.
- 20 MacLennan PA, Brown RA, Rennie MJ: A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 1987;215:189–191.
- 21 MacLennan PA, Smith K, Weryk B, Watt PW, Rennie MJ: Inhibition of protein breakdown by glutamine in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett* 1988;237:133–136.
- 22 Wu GY, Thompson JR: The effect of glutamine on protein turnover in chick skeletal muscle in vitro. *Biochem J* 1990;265:593–598.
- 23 Naka S, Saito H, Hashiguchi Y, Lin M-T, Furukawa S, Inaba T, Fukushima R, Wada N, Muto T: Alanyl-glutamine-supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in rat protracted bacterial peritonitis model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1996;20:417–423.
- 24 Jepson MM, Bates PC, Broadbent P, Pell JM, Millward DJ: Relation between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 1988;255:E166–E177.
- 25 Holecsek M, Sprongl L, Tichy M: Effects of hyperammonemia on leucine and protein metabolism in rats. *Metabolism* 2000;49:1330–1334.
- 26 Tiao G, Lieberman M, Fischer JE, Hasselgren PO: Intracellular regulation of protein degradation during sepsis is different in fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol* 1997;272:R849–R856.

Reproduced with permission of the copyright owner. Further reproduction prohibited without permission.

10.2.2 Přednášky, abstrakta, postery

Muthný T, Kovařík M, Šišpera L, Tilšer I, Holeček M: Porovnání metabolismu proteinů a aminokyselin v odlišných typech kosterního svalu potkana. 22. Kongres SKVIMP, Hradec Králové, 2.– 4.3. 2006 (poster). Abstrakt publikován ve sborníku Klinická výživa a metabolická péče v gastroenterologii a gerontologii, s. 126, ISBN 80-86225-91-7

Muthny T, Kovarik M, Sispera L, de Meijere A, Tilser I, Holecek M: Effect of belactosin A and C on protein and amino acid metabolism in rat skeletal muscle. 28th Congress of ESPEN, Istanbul, Turecko, 19.-22.10.2006 (poster). Abstrakt publikován v Abstract book, s. 182

Muthný T, Kovařík M, Šišpera L, Tilšer I, Holeček M: Evaluace jednorázového subkutánního podání terpentynového oleje jako modelu proteokatabolismu. 83. Fyziologické dny, Brno, 6.-8.2. 2007 (přednáška). Abstrakt publikován ve Physiol Res 2007;56(3):P24

Holecek M, Safranek R, Kadlcikova J, Muthny T: Effect of proteasome inhibitor MG 132 on protein metabolism in whole body and isolated skeletal muscle. XXXV International Congress of Physiological Sciences, San Diego, CA, 31. 3. – 5. 4. 2005 (přednáška). Abstrakt publikován ve FASEB J 2005;19(5):A1471

Kovařík M, Tisančinová J, Šišpera L, Muthný T, Holeček M: Vliv inhibitoru proteazomu MLN273 na metabolismus proteinů a aminokyselin u hypertermie. 22. Kongres SKVIMP, Hradec Králové, 2.– 4.3. 2006 (poster). Abstrakt publikován ve sborníku Klinická výživa a metabolická péče v gastroenterologii a gerontologii, s. 122, ISBN 80-86225-91-7

Holecek M, Muthny T, Kovarik M, Sispera L: Proteasome inhibitor MG 132 has different effect on protein metabolism under in vivo and in vitro conditions (přednáška a poster). 4th Cachexia Conference, Tampa, USA, 6.-9.12. 2007. Abstrakt publikován v Abstract Book, s. 24 a s. 77