

О. А. Красільнікова, Ю. О. Натарова, Н. А. Бабенко

Особливості впливу тироксину на синтез сфінгозину та фосфоінозитидів у печінці щурів в онтогенезі

Исучали возрастные особенности синтеза свободного сфингозина, фосфатидилинозита, фосфатидилинозит 4-фосфата и фосфатидилинозит 4,5-бисфосфата в печени и влияние тироксина на этот процесс. Установлено, что к старости существенно снижается скорость синтеза в печени сфингозина, фосфатидилинозита и фосфатидилинозит 4-фосфата. Экзогенный тироксин увеличивает включение меченых предшественников в сфингозин 3- и 24-месячных животных, снижает — в фосфатидилинозит и фосфатидилинозит 4-фосфат 3-месячных крыс и повышает — в фосфатидилинозит 4,5-бисфосфат у старых крыс.

Вступ

З віковою зміною функції щитовидної залози пов'язані серйозні порушення обміну речовин і ліпідів, і серед них є такі, що призводять до розвитку цілої низки патологічних процесів у людини і тварин. Однак особливості регуляції метаболізму ліпідів у постнатальний період онтогенезу ще не достатньо вивчені; не з'ясовані механізми дії тиреоїдних гормонів на клітини та причини вікових особливостей реалізації гормонального сигналу. Важливу роль у передачі гормонального сигналу в клітину та формуванні фізіологічної відповіді відіграють ліпіди, які містять інозит, та сфінголіпіди плазматичних мембран. Встановлено, що посилення обміну цих ліпідів під дією регуляторного фактора на клітину супроводжується утворенням біологічно активних молекул — регуляторів специфічної функції клітин, їх проліферації, диференціації та, іноді, апоптозу [12, 13]. Попередніми дослідженнями встановлено, що введення тироксину дослідним тваринам викликає істотне підвищення включення міченої пальмітинової кислоти до фосфатидилінозиту та поліфосфоінозитидів і посилює обмін сфінгом'єліну в печінці молодих, статевозрілих тварин [2, 5]. Продемонстровано, що стимулююча дія гормону на синтез фосфоінозитидів імітується форболовим ефіром та знімається екзогенним сфінгозином [5].

Метою цього дослідження було вивчення впливу тироксину на синтез сфінгозину, фосфатидилінозиту та поліфосфоінозитидів у печінці білих щурів різного віку.

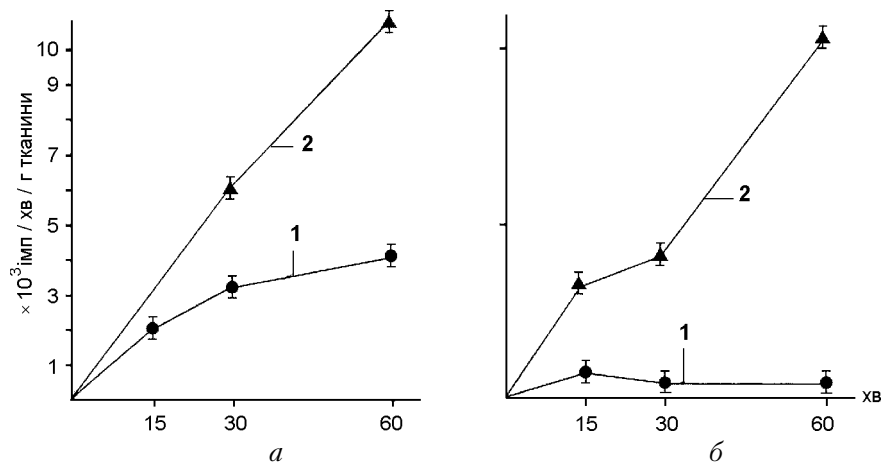
Методика

Дослідження проводили на інтактних щурах-самцях лінії Вістар 3- та 24-місячного віку. Перед розкриттям черевної порожнини тварин наркотизували дієтиловим ефіром. Печінку перфузували 0,9%-м льодяним NaCl. Шматочки

тканини печінки отримували продавленням через металеву решітку з діаметром отворів 0,3 мм та інкубували протягом 0, 15, 30 та 60 хв при 37 °С. в середовищі, що містило: 118 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 1 ммоль/л $\text{KН}_2\text{PО}_4$, 1 ммоль/л MgSO_4 , 2 ммоль/л CaCl_2 , 0,2 % NaHCO_3 , 0,2 % альбуміну, 60 мг/л пеніциліну, 100 мг/л стрептоміцину. Для визначення сфінгозину шматочки тканини інкубували при наявності 1,96 мкмоль ^{14}C пальмітинової кислоти (1700 ГБк/ммоль), ліпідів, які містять інозит – 3,45 ммоль ^{14}C олеїнової кислоти ($214 \cdot 10^{10}$ мБк/ммоль, фірми «Amersham», Англія). Частина проб містила L-тироксин ($1 \cdot 10^{-8}$ моль/л фірми «Reanal», Угорщина). Реакцію зупиняли додаванням охолодженої суміші хлороформу з метанолом (1 : 2, внутрішньовенно для сфінгозину) або суміші метанолу з концентрованою HCl (100 : 6 внутрішньовенно, для інозитліпідів). Подальшу екстракцію сфінгозину проводили за методом Кейтса [4], а фосфоінозитидів за рекомендаціями Абдель-Латіфа [9]. Хроматографічний розподіл фосфоліпідів проводили в тонкому шарі силікагелю Вельм (ФРН) у системах розчинників для сфінгозину: хлороформ – метанол – 10 % NH_4OH (40 : 10 : 1 внутрішньовенно) та для ліпідів, що містять інозит: хлороформ – метанол – ацетон – оцтова кислота – H_2O (30 : 11,5 : 10 : 96 внутрішньовенно). Радіоактивність зразків вимірювали в сцинтиляційній рідині ЖС-8 за допомогою лічильника радіоактивності БЕТА (вітчизняного виробництва).

Результати та їх обговорення

Встановлено, що інкубація шматочків тканини печінки щурів різного віку з ^{14}C пальмітиновою кислотою протягом 0–60 хв супроводжується включенням мітки до сфінгозину (рисунок). Інтенсивність синтезу вільного сфінгозину *de novo* в печінці 3-місячних щурів є значно вищою порівняно з 24-місячними щурами. Відомо, що пальмітинова кислота є попередником у синтезі сфінгозину *de novo* [13]. Довголанцюгові сфінгоїдні луги утворюються внаслідок реакції конденсації пальмітоїл-СоА і серину, яку каталізує серинпальмітоїл трансфераза [КФ 2.3.1.50]. Встановлено, що швидкість синтезу



Динаміка включення ^{14}C пальмітинової кислоти до сфінгозину в нормі та під впливом тироксину в печінці 3-місячних щурів (а) і 24-місячних щурів (б): 1 – норма; 2 – наявність тироксину. За віссю абсцис – час інкубації (хв), за віссю ординат – інтенсивність включення позначки (1×10^3 імп/хв/г тканини).

сфінгозину в гепатоцитах щурів залежить від наявності в клітині його попередників — пальмітинової кислоти та серину. Не виключено, що в наших експериментах вікова відмінність у синтезі сфінгозину *de novo* певною мірою пов'язана з особливостями надходження до клітин печінки міченої жирної кислоти та з різним, у різному віці, вмістом серину. Однак не виключено, що у старих тварин порушено синтез ключового ферменту утворення сфінгозину — серин-пальмітоїл трансферази.

Під впливом тироксину швидкість синтезу сфінгозину в печінці як молодих, так і старих щурів різко підвищується. Таким чином, уже на 60-й хвилині інкубації шматочків печінки з гормоном вміст наново синтезованого ліпиду в печінці 24-місячних тварин сягає рівня 3-місячних щурів (див. рисунок). У цілому тироксин вирівнює вікову динаміку синтезу вільного сфінгоїдного лугу, що є свідченням важливості ролі цього гормону в зміні швидкості синтезу сфінгозину в онтогенезі.

Нині ще не з'ясовані механізми дії гормону на процес утворення сфінгозину в печінці. Раніше проведеними дослідженнями було встановлено, що через 48 год після одноразової ін'єкції тироксину молодим щурам-самцям лінії Вістар спостерігається істотне багаторазове підвищення швидкості синтезу цераміду та сфінгомієліну в безпосередньо отриманих гепатоцитах, під час їх інкубації з [^{14}C] пальмітиновою кислотою [6]. Не виключено, що активація утворення вільного сфінгозину в печінці під впливом гормону є головною причиною збільшення вмісту інших сфінголіпідів у печінці. Той факт, що за умов цього експерименту активуючий ефект тироксину на синтез сфінголіпідів виникає в процесі короткочасної дії гормону на тканину печінки, є свідченням залучення шляху, який не пов'язаний з дією гормону безпосередньо на геном та білоксинтезуючий апарат клітини.

Зважаючи на те, що сфінгозин, з одного боку, є потужним модулятором обміну фосфоінозитидів у клітинах печінки та інших типів тканин [5, 10], та на те, що під впливом тироксину відбувається різке підвищення швидкості синтезу сфінгозину — з іншого, наступна серія експериментів присвячена вивченню впливу тиреоїдних гормонів на синтез фосфатидилінозиту та поліфосфоінозитидів у печінці білих щурів. Встановлено, що у 3-місячних тварин через 15 хв інкубації тканини печінки максимальне включення міченої олеїнової кислоти до складу фосфатидилінозит 4-фосфату та фосфатидилінозиту сягає 42,9 і 32 % відповідно від загальної суми включення до ліпідів, які містять інозит. Фосфатидилінозит 4,5-бісфосфат має більш низьке включення позначки — 24 % (табл. 1).

Зі збільшенням часу інкубації змінюється і швидкість включення міченої олеїнової кислоти до ліпідів, які їх вивчали. В цілому, вміст міченого [^{14}C] фосфатидилінозиту в печінці молодих 3-місячних тварин за 60 хв інкубації збільшився на 319,9 %, в той же час, як вміст міченого [^{14}C] фосфатидилінозит 4-фосфату різко збільшився (на 182,2 %) уже на 30-ту хвилину інкубації, і в подальшому стабілізувався. Іншим способом розподілялася з часом мічена олеїнова кислота до складу фосфатидилінозит 4,5-бісфосфату. Вміст міченого фосфатидилінозит 4,5-бісфосфату в печінці 3-місячних тварин стабілізувався на ранніх строках інкубації (до 15 хв) та в подальшому не змінювався.

Таблиця 1. Динаміка включення [¹⁴C] олеїнової кислоти до фосфоліпідів, які містять інозит, тканини печінки 3 та 2-місячних білих щурів (×10³ імп / хв / г тканини)

Ліпід	Час інкубації		
	15 хв	30 хв	60 хв
	3-місячні (n=9)		
Фосфатидилінозит	4,543±0,731	—	19,074±5,999*
Фосфатидилінозит 4-фосфат	6,068±0,735	11,054±0,937*	14,255±2,287*
Фосфатидилінозит 4,5-бісфосфат	3,505±0,628	5,108±0,937	4,297±0,437*
	24-місячні (n = 5)		
Фосфатидилінозит	3,010±0,494	4,375±0,498	4,800±0,483*
Фосфатидилінозит 4-фосфат	4,620±0,701	4,891±0,339*	5,800±0,608*
Фосфатидилінозит 4,5-бісфосфат	3,871±0,248	4,703±0,728	3,397±0,444*

* P < 0,001

Відомо, що насичені жирні кислоти, взагалі, включаються до складу фосфоліпідів під час їх синтезу *de novo*, на відміну від них, ненасичені — під час реакцій деацилювання-ацилювання [11]. З погляду на це, є підстави вважати, що за наших умов експерименту мічена олеїнова кислота включається до складу вже утворених ліпідів, які містять інозит. Не виключено, однак, що олеїнова кислота спочатку включається до складу фосфатидилінозиту, якого надалі піддають низці поступових фосфорилювань під впливом кіназ, що призводить до утворення в печінці мічених фосфатидилінозит 4-фосфату та фосфатидилінозит 4,5-бісфосфату.

Отримані нами результати щодо розподілення мітки серед поліфосфоінозитидів узгоджуються з даними, що були отримані на плазматичних мембранах клітин зародків в'юна [3]. Не виключено, що за цих умов має спостерігатися переважання активності фосфатидилінозиткіназ над фосфомоноестеразною активністю, і також більш високий рівень фосфатидилінозит 4-фосфату (див. табл. 1) віддзеркалює підвищену активність фосфатидилінозит 4-кінази порівняно з фосфатидилінозит 4-фосфат 5-кіназою.

Показано, що під старість змінюється ліпідний метаболізм, який виявляється у зміні інтенсивності катаболізму та ресинтезу фосфоліпідів у клітинах печінки. Наприклад, встановлено, що обмін ацильних залишків фосфоліпідів клітин печінки різко підвищується до 3-місячного віку, а потім під старість знижується [7].

Отримані нами відомості щодо динаміки включення [¹⁴C] олеїнової кислоти до фосфоліпідів, які містять інозит, у 24-місячних тварин узгоджуються з положеннями, що їх було викладено раніше. Ми встановили, що у старих тварин більш низький загальний рівень включення міченої олеїнової кислоти до складу більшості ліпідів, які вивчали. Так, наприклад, вміст [¹⁴C] фосфатидилінозиту протягом усієї інкубації (60 хв) збільшився на 59,5 %, порівняно з 319,9 % у молодих тварин (див. табл. 1). Встановлено, що у старих 24-місячних тварин розподіл мітки серед поліфосфоінозитидів має зовсім інший характер, ніж у молодих. Якщо у молодих тварин на 60-й хвилині інкубації печінки з [¹⁴C] олеїновою кислотою серед мічених ліпідів

мають перевагу фосфатидилінозит та фосфатидилінозит 4-фосфат, то у старих щурів спостерігається рівномірний розподіл міченої кислоти серед тих класів фосфоліпідів, які вивчалися.

Як було доведено, тироксин істотно впливає на ліпідний обмін [7]. Він стимулює зміну вмісту фосфоліпідів у плазматичних мембранах, які є основним місцем зосередження поліфосфоінозитидів. У наших дослідах було вивчено вплив тироксину на вміст мічених інозитліпідів протягом 60 хв інкубації шматочків тканини печінки тварин 3- та 24-місячного віку. Встановлено, що у молодих 3-місячних тварин тироксин суттєво знижує кількість мічених фосфатидилінозиту та фосфатидилінозит 4-фосфату під час інкубації шматочків тканини печінки (табл. 2) на 77,1 і 42,6 % відповідно; в той же час, вміст міченого [¹⁴C] фосфатидилінозит 4,5-бісфосфату на 60-й хвилині інкубації печінки з тироксином достовірно не змінюється.

Раніше було визначено, що тироксин стимулює процес накопичення міченого [¹⁴C] пальмітиноювою кислотою фосфатидилінозит 4,5-бісфосфату в гепатоцитах, а фосфатидилінозит 4-фосфат 5-кіназа є мішенню в дії тироксину в клітинах печінки. Виявлено, що природний продукт обміну сфінголіпідів у клітинах печінки — сфінгозин — істотно змінює характер дії тироксину на синтез фосфатидилінозит 4,5-бісфосфату *de novo* та інгібує цей процес в інтактній печінці [3]. Повідомляли також і про активацію під впливом сфінгозину фосфоліпаз C, специфічних до фосфоліпідів, які містять інозит [10].

У цій роботі встановлено, що на 60-й хвилині інкубації шматочків тканини печінки 3-місячних тварин при наявності тироксину різко збільшується вміст наново синтезованого вільного сфінгозину (див. рисунок). Імовірно, що зниження вмісту [¹⁴C] мічених фосфатидилінозиту та фосфатидилінозит 4-фосфату за даних умов (див. табл. 3) може пояснюватися активацією сфінгозином фосфоінозитидспецифічної фосфоліпази C [10], і, також, посиленням під дією тироксину використання міченої жирної кислоти в процесах окиснення у молодих тварин [8].

Таблиця 2. Вплив тироксину ($1 \cdot 10^8$ моль/л) *in vitro* на вміст [¹⁴C] олеїнової кислоти в фосфоліпідах, які містять інозит, тканини печінки білих щурів 3- та 24-місячного віку (60 хв інкубації, $\times 10^3$ імп/хв/г тканини)

Ліпід	Контроль	Тироксин
3-місячні (n = 9)		
Фосфатидилінозит	19,074±5,999	4,377±0,688**
Фосфатидилінозит 4-фосфат	14,255±2,287	8,175±1,335**
Фосфатидилінозит 4,5-бісфосфат	4,297±0,437	4,828±0,596
24-місячні (n = 5)		
Фосфатидилінозит	4,800±0,483	4,813±0,653
Фосфатидилінозит 4-фосфат	5,800±0,608	6,165±0,799
Фосфатидилінозит 4,5-бісфосфат	3,937±0,444	5,273±0,472**

Примітка. Тироксин вносили до інкубаційного середовища в концентрації 1×10^{-8} моль/л. ** P < 0,05.

Зовсім по-іншому тироксин впливає на процес накопичення мічених [^{14}C] олеїною кислотою фосфоїнозитидів у печінці старих 24-місячних щурів. Так, інкубація шматочків тканини цих тварин при наявності тироксину протягом 60 хв не призводить до змін вмісту [^{14}C] фосфатидилінозиту та [^{14}C] фосфатидилінозит 4-фосфату, на той час, як вміст [^{14}C] фосфатидилінозит 4,5-бісфосфату збільшується за даних умов експерименту на 33,9% (див. табл. 2).

Попередніми дослідженнями [1] було продемонстровано, що у старих тварин під впливом тироксину внаслідок переорієнтування використання жирних кислот з процесів окиснення на процеси ацилювання відбувається істотне посилення синтезу фосфоліпідів у печінці. Вірогідно, саме цим визначаються особливості впливу тироксину, які були виявлені в нашому дослідженні, на розподіл фосфоїнозитидів, мічених олеїною кислотою, у печінці 24-місячних тварин.

Таким чином, наші результати підтверджують існування вікових особливостей синтезу сфінгозину та фосфоїнозитидів в печінці та важливу роль тиреоїдних гормонів у регулюванні обміну цих ліпідів у постнатальному онтогенезі. Результати цієї роботи, а також дані, що їх було отримано раніше [5] свідчать про функціональний взаємозв'язок обміну сфінголіпідів і ліпідів, які містять інозит, у печінці тварин різного віку.

О. А. Krasilnikova, J. A. Natarova, N. A. Babenko

AGE PECULIARITIES OF THYROXINE INFLUENCES ON SPHINGOSINE AND PHOSPHOINOSITIDES SYNTHESIS IN RAT LIVER

The age peculiarities of sphingosine, phosphatidylinosite, phosphatidylinosite 4-phosphate and phosphatidylinosite 4,5-bisphosphate in liver and thyroxine influences on this processes has been investigated. It has been determined that sphingosine, phosphatidylinosite and phosphatidylinosite 4-phosphate synthesis in liver drop in old age. It was found that thyroxine enchances the labelled precursor incorporation into sphingosine of 3- and 24-old rat, and phosphatidylinosite 4,5-bisphosphate — 24-old animals and decreases the synthesis of phosphatidylinosite and phosphatidylinosite 4-phosphate in liver of the young rats.

Kharkov State University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бабенко Н.А.* Гормональные и диетические факторы регуляции липидного обмена в онтогенезе. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Харьков, 1992. — С.38.
2. *Бабенко Н.А., Филоненко Н.С.* Влияние тиреоидных гормонов и диацилглицериннов на метаболизм сфингомиелина в ядрах клеток печени крыс разного возраста // Биохимия. — 1992. — **57**, № 3. — С.371-377.
3. *Дробот Л.Б., Кошельник Ю.Р., Шевчук М.Я., Кусень С.И.* Влияние инсулина и гуаниловых нуклеотидов на метаболизм полифосфоинозитидов в плазматических мембранах клеток зародышей выюна // Биол. мембраны. — 1991. — **8**, № 10. — С.121-125.
4. *Кейтс М.* Техника липидологии. — М.: Мир, 1975. — 322 с.

5. Красильникова О.А., Бабенко Н.А. Роль тиреоидных гормонов в регуляции синтеза фосфатидной кислоты, фосфатидинозита и полифосфоинозитидов в клетках печени // Биохимия. — 1996. — **61**, №8. — С.235-245.
6. Натарова Ю.А., Красильникова О.А., Бабенко Н.А. Влияние тироксина на синтез сфингомиелина и фосфатидилхолина в гепатоцитах крыс. // Укр. биохим. журн. — 1996. — **68**, №5. — С.115-118.
7. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. Возрастные особенности влияния тиреоидных гормонов на липиды клеток и клеточных ядер печени белых крыс. — В кн.: Биохимия и физиология возрастного развития организма. — К.: Наук. думка, 1992. — С.198-208.
8. Пашкова А.А., Костикова С.Н., Любецкая В.Г. К вопросу о механизме стимулирующего действия тироксина у животных разного возраста. — В кн. Физиология, биохимия и биофизика возрастного развития. — К.: Наук. думка. — 1980. — С.178-182.
9. Abdel-Latif A.A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides and the generation of second messengers // Pharmacological Reviews. — 1986. — **38**, №3. — P. 227-272.
10. Chao C.P., Landerkind S.J.F., Ballon L.R. Sphingosine-mediated phosphatidylinositol metabolism and the calcium mobilisation // J. Biol. Chem. — 1994. — **269**, №8. — P.5849-5856.
11. Jacobsson A., Ericsson J., Dalner G. Metabolism of fatty acids and their incorporation into phospholipids of the mitochondria and endoplasmic reticulum in isolated hepatocytes determined by isolation of fluorescence derivatives // Biochem. et biophys. Acta. Lipids and lipid metabolism. — 1990. — **1046**, №3. — P.277-287.
12. Kolesnik R., Fuks Z. Ceramide: a signal for apoptosis or mitogenesis? // J. Exp. Med. — 1995. — **181**. — P.1949-1952.
13. Merrill A.H., Jones D.D. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism // Biochem. et Biophys. Acta. — 1990. — **1044**, №1. — P.1-12.

Харків. ун-т
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 30.01.97