

Л.Х.М. Хассунех, Я.О. Семенова, О.А. Красильникова, Н.О. Бабенко

Вікові особливості вмісту сигнальних ліпідів у печінці та мозку щурів

Изучено содержание сигнальных липидов в печени и разных отделах мозга (гиппокамп, новая кора) крыс 3- и 24-месячного возраста. При старении наблюдается накопление диацилглицеринов в печени, а также свободных жирных кислот и керамидов во всех исследуемых тканях. В то же время масса фосфатидилсерина существенно ниже в гиппокампе старых животных по сравнению со взрослыми крысами. Возрастные изменения содержания глицеро- и сфинголипидов могут приводить к нарушению чувствительности клеток к действию регуляторных сигналов в старости.

ВСТУП

В останні роки багато уваги приділяється вивченню метаболізму вільних жирних кислот, діацилглицеринів (ДАГ), керамідів (ЦМ) і фосфатидилсерину (ФС), які є важливими компонентами біологічних мембран і відіграють значну роль у регуляції широкого спектра фізіологічних функцій клітини. ФС бере участь у процесі сигнальної трансдукції як кофактор протеїнкінази С [5], модулятора синаптосомальних бензодіазепінових рецепторів [17] і активатора протеїнкінази cRaf-1 [12]. ДАГ є алостеричними активаторами деяких ізоформ протеїнкінази С [6] і залучені до регуляції активності білків Ras та Rho [10]. Відомо, що дія цілої низки онкогенів супроводжується збільшенням вмісту ДАГ у клітинах. ЦМ активують цілу низку ферментів, серед яких стрес-активуюча протеїнкіназа, протеїнкіназа С ζ , фосфоліпази A_2 та Д, фактор транскрипції NF- κ B [23]. ЦМ беруть участь у регуляції проліферації, диференціації клітин та індукції апоптозу.

Показано, що вікові порушення у чутливості різних типів клітин до дії агоністів та їх функціональної активності тісно пов'язані зі змінами у шляхах передачі сигналу.

Спостерігалася кореляція між поступовим погіршенням пам'яті у старих щурів, гідролізом поліфосфоїнозитидів та утворенням ДАГ [22]. Установлений тісний зв'язок між змінами функціональної активності Т-лімфоцитів, вилучених у літніх донорів, та порушеннями агоністзалежного утворення ДАГ та інозитфосфатів [11]. Підвищення вмісту вільних жирних кислот призводить до посилення синтезу та збільшення вмісту ДАГ і ЦМ у печінці, скелетних м'язах і жировій тканині, що є важливою причиною резистентності клітини до інсуліну та розвитку діабету [24]. Посилення вивільнення під дією фосфоліпази A_2 поліненасичених жирних кислот і продукції простагландину E_2 (ПГЕ₂) призводить до порушення регуляції імунної та запальної відповіді у старих мишей [26]. Підвищення продукції ЦМ у макрофагах таких тварин призводить до стимуляції циклооксигенази та перетворення арахідонової кислоти на ПГЕ₂ [25, 26]. Збільшення вмісту ЦМ у різних тканинах головного мозку у разі нейродегенеративних захворювань, які найбільш часто зустрічаються у старому віці, є однією з причин індукованої β -амілоїдним пептидом загибелі нейронів [3]. Проте особливості

© Л.Х.М. Хассунех, Я.О. Семенова, О.А. Красильникова, Н.О. Бабенко

базального вмісту сигнальних ліпідів у різних типах клітин в умовах нормального фізіологічного старіння вивчено ще недостатньо. Тому метою нашої роботи було дослідження особливостей вмісту ФС, ДАГ, ЦМ та їх метаболітів у печінці і різних відділах головного мозку дорослих і старих тварин.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 3- та 24-місячних самцях щурів лінії Вістар по 10 у кожній групі. Перед сакрифацією тварин наркотизували діетиловим ефіром. Печінку перфузували холодним фізіологічним розчином. Ліпіди з гомогенатів печінки, гіпокампа та неокортекса екстрагували за методом Блайя та Дайера [7] та розділяли на фракції методом тонкошарової хроматографії. Системи розчинників: для нейтральних ліпідів – гексан: діетиловий ефір: оцтова кислота (73:25:2, за об'ємом); для сфінго-

ліпідів: 1 – діетиловий ефір, 2 – хлороформ: метанол: вода (40:10:1, за об'ємом), для ФС – хлороформ: метанол: оцтова кислота: мурашина кислота: вода (35:15:6:2:1, за об'ємом). Хроматографічні пластини проявляли в парах йоду. Ліпіди ідентифікували порівнянням зі стандартами. Їх вміст визначали за методом Марча та Вейнштейна [19]. Експериментальні результати наведено як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього, для порівняння використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA, Fisher LSD – test) і критерій t Стьюдента. Розходження між групами вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Установлено, що вміст вільних жирних кислот у печінці та відділах мозку (гіпокамп і неокортекс) вірогідно збільшується у старих тварин у порівнянні з дорослими (рис. 1). Це може бути пов'язане з підвищенням

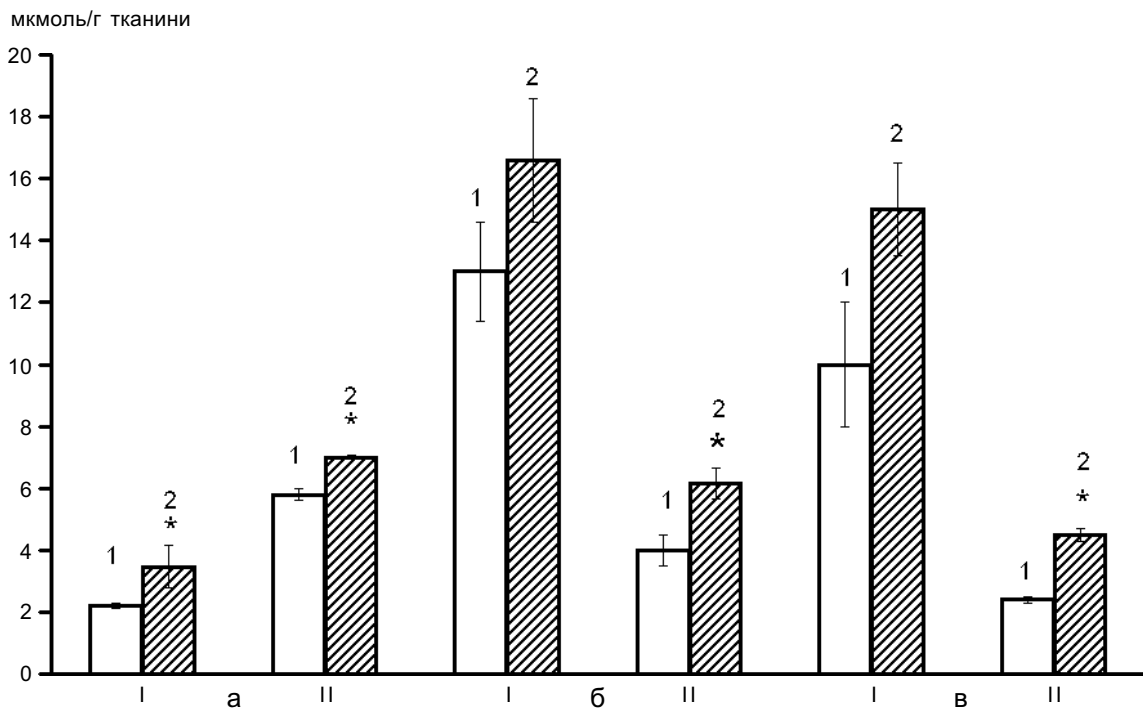


Рис. 1. Вміст діацилгліцеринів (I) і вільних жирних кислот (II) у печінці (а), гіпокампі (б) і корі мозку (в) щурів різного віку: 1 – 3 міс, 2 – 24 міс.

* $P < 0,05$ відносно тримісячних тварин (тут і на рис. 2)

активності ендогенних фосфоліпаз А на пізніх етапах онтогенезу. На користь цього припущення свідчать дані про збільшення вмісту лізофосфоліпідів у клітинах мозку старих щурів [1].

Результати відносно вікового збільшення вмісту вільних жирних кислот у відділах головного мозку узгоджуються з даними літератури. У різних відділах головного мозку старих щурів спостерігається накопичення цих кислот, що призводить до змін функціонального стану рецепторного апарату нервових клітин [9], а у плазматичних мембранах – до зниження чутливості А1-аденозинових рецепторів. Встановлено, що останні наявні на поверхні нервових клітин різних відділів головного мозку, зокрема неокортекса та гіпокампа (клітин піраміди, полів СА1, СА3 і гранулярних клітин зубчастої фасції). Активація пресинаптичних А1-аденозинових рецепторів супроводжується Ca^{2+} -залежним інгібуванням вивільнення норадреналіну в синаптичний простір, а постсинаптичних – стимулює ефекти катехоламінів через α_1 -адренорецептори. Таким чином, накопичення вільних жирних кислот у клітинах мозку щурів при старінні може спричинювати порушення чутливості нервових клітин до дії нейротрансмітерів і змін функціонування в клітинах систем сигнальної трансдукції.

Підвищення вмісту вільних жирних кислот у різних тканинах корелює з посиленням синтезу ДАГ і збільшенням їх маси [24]. Не виключено, що підвищення вмісту вільних жирних кислот у тканинах старих щурів у порівнянні з дорослими тваринами призводить до підвищення базального вмісту іншого сигнального ліпиду – ДАГ.

Нами встановлено, що базальний вміст ДАГ у печінці старих щурів вірогідно збільшувався порівняно зі значеннями у молодих статевозрілих тварин, тоді як у досліджених відділах головного мозку спостерігалася лише тенденція до збіль-

шення (див. рис. 1). Підвищення вмісту ДАГ у клітині може відбуватися декількома шляхами: в процесі гідролізу поліфосфоїнозитидів специфічною фосфоліпазою С, при послідовній активації специфічної до фосфатидилхоліну або фосфатидилетаноламіну фосфоліпази Д і фосфотидатфосфогідролази. Саме змінами активації цих ферментів у старості пояснюють вікові відмінності утворення ДАГ у неокортексі [13]. Окрім того, ДАГ можуть утворюватись у процесі синтезу сфінгомієліну з ЦМ і фосфатидилхоліну при дії фосфатидилхолін:ЦД-холін-фосфотрансферази. У нашій лабораторії встановлено, що молекулярні різновиди ДАГ, які накопичуються у клітинах печінки старих тварин, за своїм жирнокислотним складом дуже близькі до складу фосфатидилхоліну [14]. Доведено також, що у старих тварин підвищення вмісту ДАГ у печінці та окремих мембранних структурах гепатоцитів корелює з активацією сфінгомієлін-синтази. Крім того виявлено, що однією з причин накопичення ДАГ у плазматичних мембранах клітин печінки є зниження використання цієї сполуки у процесах синтезу гліцерофосфоліпідів і триацилгліцеринів на тлі підвищення синтезу ДАГ при збільшенні в тканинах вмісту його попередників – вільних жирних кислот [16]. Однак хронічне підвищення вмісту вільних жирних кислот у клітинах є причиною накопичення не лише ДАГ, але й ЦМ [24].

Відомо, що вільні жирні кислоти є попередниками сфінголіпідів і їх синтез починається з реакції конденсації пальмітил-СоА та серину, яку каталізує пальмітоїл-трансфераза, внаслідок чого утворюється кетосфінганін. Далі кетосфінганін відновлюється до сфінганіну – субстрату ацилтрансферази, в результаті дії якої утворюється ЦМ. Зважаючи на це, можливо припустити, що збільшення вмісту вільних жирних кислот – важлива причина підвищення вмісту ЦМ у печінці та досліджених відділах головного мозку (рис.2).

Вікові зміни вмісту даного ліпиду в тканинах мозку можуть бути причиною порушення їх функціонального стану у старих тварин. Так, показано, що активацію нейтральної сфінгомелінази клітин гіпокампа, яка призводить до збільшення вмісту ЦМ у клітинах, стимулює загибель нейронів [8]. Використання специфічного інгібітора нейтральної сфінгомелінази сцифостатину повністю відміняло цей ефект. Підвищення вмісту ЦМ у печінці старих щурів відбувається у процесі активації як нейтральних, так і кислих сфінгомеліназ і корелює з підвищенням вмісту інтерлейкіну-1 β і розвитком запальних реакцій [4, 18].

Відомо, що ЦМ є попередником головного сфінголіпиду клітин – сфінгомеліну. При старінні вміст останнього збільшувався тільки у неокортексі, тоді як у решті органів вірогідно не змінювався (див. рис.2). У корі головного мозку спостері-

гається одночасне підвищення вмісту вільних жирних кислот, ЦМ і сфінгомеліну (див. рис 1, 2). Отримані результати свідчать про посилення синтезу сфінголіпідів де novo у неокортексі при старінні і підтверджуються даними літератури. Так, виявлено, що з віком посилюється інтенсивність включення [^{14}C]серину до сфінгомеліноклітин головного мозку, яке корелює зі збільшенням вмісту сфінгомеліну у нейронах неокортекса [13].

Водночас доведено, що існує тісний взаємозв'язок обміну сфінголіпідів і ФС. Так, останній активує нейтральну сфінгомеліназу плазматичних мембран клітин печінки та мозку [20]. Мітка фосфатидил-[3- ^{14}C]серину дуже швидко виявляється у знову синтезованих ЦМ та сфінгомеліну фібробластів, тоді, як ЦМ може пригнічувати синтез ФС [21].

Установлено, що вміст ФС мало змінюється з віком у печінці (таблиця). Водночас

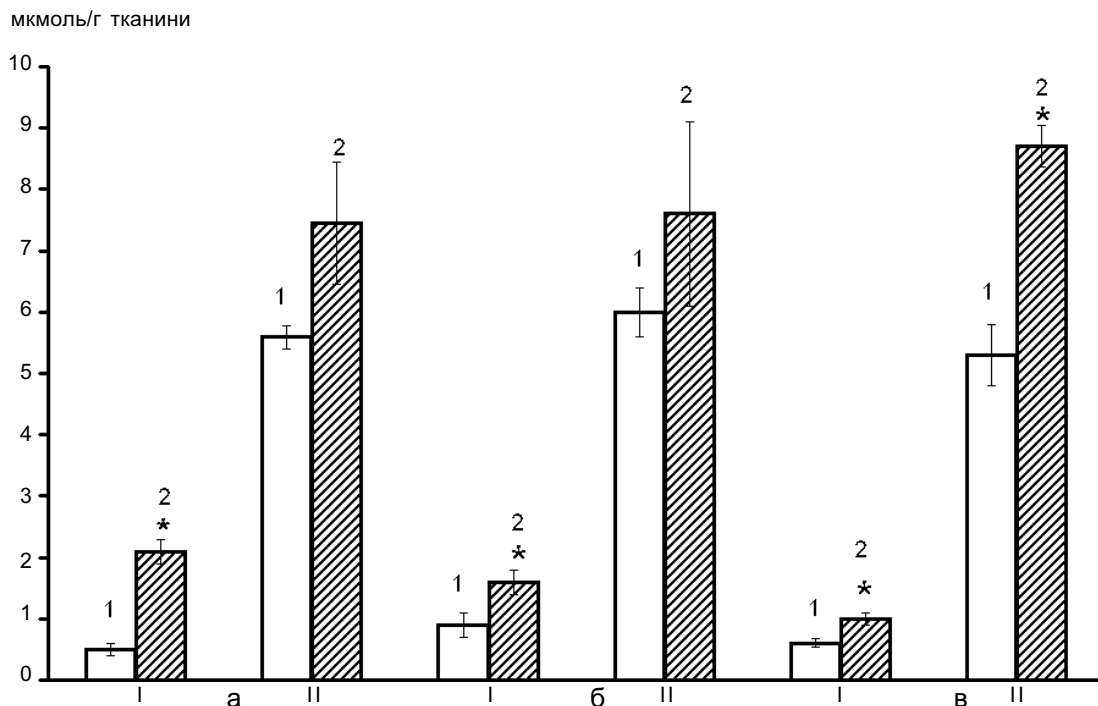


Рис. 2. Вміст цераміду (I) і сфінгомеліну (II) у печінці (а), гіпокампі (б) та корі мозку (в) щурів різного віку: 1 – 3-міс, 2 – 24-міс

вміст фосфоліпиду різко знижується у гіпокампі старих тварин порівняно з дорослими. Відомо, що ФС відіграє важливу роль у різних клітинах і тканинах завдяки дії на ключові ланки сигнальної трансдукції [5, 12, 17]. Однак для нормального функціонування нейронів відділів головного мозку він має особливе значення. Так, індукованій амілоїдним β -пептидом (A β 1-40) загибелі нейронів кори та гіпокампа передують не лише накопичення ЦМ, але й суттєві зміни обміну ендогенного ФС [15]. Збільшення в гіпокампі вмісту ФС, збагаченого докозогексаєновою кислотою ряду n-3, стимулює транслокацію в мембрані Akt, її активацію і, таким чином, знижує чутливість нейронів до дії гіпоксії та A β 1-40 [2]. Зважаючи на це, можна припускати, що зниження вмісту ФС у гіпокампі старих тварин є однією з причин підвищення чутливості його клітин до дії оксидативного стресу та інших несприятливих чинників.

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що при старінні в усіх проаналізованих тканинах спостерігається накопичення вільних жирних кислот і ЦМ. При цьому у печінці збільшується базальний вміст ДАГ, а у структурах мозку – сфінгомієліну та зниження ФС. Вікове накопичення нейтральних ліпідів і сфінголіпідів клітин печінки та різних відділів мозку може призводити до порушення чутливості цих клітин до дії регуляторних стимулів і гормонів.

Вміст фосфатидилсерину (нмоль/мг білка) у тканинах щурів різного віку (M \pm m; n=10)

Тканина	Вік щурів	
	3 міс	24 міс
Печінка	11,7 \pm 1,85 (2,28 \pm 0,40)	16,2 \pm 2,05 (2,45 \pm 0,42)
Гіпокамп	102,7 \pm 6,13 (5,42 \pm 0,32)	56,9 \pm 2,26* (4,06 \pm 0,71)

Примітка. У дужках результати у мікромолях на 1 г тканини. *P < 0,05 відносно тримісячних тварин.

**Loay Khaled Mohammad Hassouneh,
Y. Semenova, O. Krasilnikova, N. Babenko**

**AGE FEATURES OF SIGNALING LIPIDS
CONTENT IN RAT LIVER AND BRAIN**

The effect of age on signaling lipids contents in rat liver and different brain regions (hippocampus, neocortex) were studied. The contents of free fatty acids in the brain, diacylglycerol in liver and ceramide in all tissues studied have been found to increase with age. Age-dependent accumulation of neutral and sphingolipids evokes the violation of cell sensitivity to extracellular signals.

*Karazin National University, Kharkiv, Ukraine;
Institute of Biology, Kharkiv, Ukraine*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Старение мозга / Под ред. акад. УССР Фролькиса В.В. – Л.: Наука, 1991. – 277с.
2. Akbar M., Galderon F., Weh Z., Kim H.-Y. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival // PNAS. – 2005. – 102, № 31. – P. 10858–10863.
3. Ayasolla K., Khan M., Singh A.K., Singh J. Inflammatory mediator and α -amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E // Free Rad. Biol. and Med. – 2004. – 37. – P. 325–338.
4. Babenko N., Shachova E. Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats // Exp. Gerontol. – 2005. – 41. – P. 32–39.
5. Bell R.M., Burns D.J. Lipids activation of protein kinase C // J. Biol. Chem. – 1991. – 266. – P. 4661–4664.
6. Berridge M.J. Intracellular signaling through inositol trisphosphate and diacylglycerol // Biol. Chem. Hoppe Seyler. – 1986. – 367, №6. – P. 447–456.
7. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canad. J. Biochem. Physiol. – 1959. – 37, №8. – P. 911–917.
8. Brann A.B., Tcherpakov M., Williams I.M. et al. Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase // J. Biol. Chem. – 2002. – 277, №12. – P. 9812–9818.
9. Cunha R.A., Constantino M.D., Fonseca E., Ribeiro J.A. Age-dependent decrease in adenosine A1 receptor binding sites in the rat brain. Effect of cis unsaturated free fatty acids // Eur. J. Biochem. – 2001. – 268, №10. – P. 2939–2947.
10. Ebinu J.O., Bottorff D.A., Chan E.Y. et al. RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs // Science. – 1998. – 280. – P.1082–1086.
11. Fulop T., Larbi A., Douziech N. et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging // Aging Cell. – 2004. – 3, №4. – P. 217–226.
12. Ghosh S., Xie W.Q., Quest A.F.G. et al. The cysteine-

- rich region of Raf-1 contains zinc, translocates to liposomes and is adjacent to a segment that binds GTP-ras // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**. – P. 10000–10007.
13. Giusto N.M., Salvador G.A., Castagnet P.I. et al. Age-associated changes in central nervous system glycerolipid composition and metabolism // *Neurochem. Res.* – 2002. – **27**, №11. – P. 1513–1523.
14. Kavok N.S., Krasilnikova O.A., Babenko N.A. Increase in diacylglycerol production by liver and liver cell nuclei at old age // *Exp. Gerontol.* – 2003. – **38**. – P. 441–447.
15. Koudinova N.V., Koudinov A.R., Yavin E. Alzheimer's Abeta 1-40 peptide modulates lipid synthesis in neuronal cultures and intact rat fetal brain under normoxic and oxidative stress conditions // *Neurochem. Res.* – 2000. – **25**. – P. 653–660.
16. Krasilnikova O.A., Kavok N.S., Babenko N.A. Drug-induced and postnatal hypothyroidism impairs the accumulation of diacylglycerol in liver and liver cell plasma membranes // *BMC Physiology*. – 2002. – **2**. – P. 12.
17. Levi deStein M., Medina J.N., DeRobertis E.D. In vivo and in vitro modulation of central type of benzodiazepine receptors by phosphatidylserine // *Mol. Brain Res.* – 1989. – **5**. – P. 9–15.
18. Lightle S.A., Oakley J.I., Nikolova-Karakashian M.N. Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging // *Mech. Ageing Dev.* – 2000. – **120**. – P. 111–125.
19. March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // *J. Lipid Res.* – 1966. – **7**, №4. – P. 574–580.
20. Martin S.F. Navarro F., Torthoffer N. et al. Neutral magnesium-dependent sphingomyelinase from liver plasma membrane: purification and inhibition by ubiquinol // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2001. – **33**. – P. 143–153.
21. Meyer S.G.E., de Groot H. [¹⁴C]serine from phosphatidylserine labels ceramide and sphingomyelin in L 929 cells: evidence for a new metabolic relationship between glycerophospholipids and sphingolipids // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – **410**. – P. 107–111.
22. Nicolle M.M., Colombo P.J., Gallagher M., McKinney M. Metabotropic glutamate receptor-mediated hippocampal phosphoinositides turnover is blunted in spatial learning-impaired aged rats // *J. Neurosci.* – 1999. – **19**, №21. – P. 9604–9610.
23. Pushkareva M., Obeid L.M., Hannun Y.A. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression // *J. Immunol. Today*. – 1995. – **60**. – P. 643–665.
24. Schmitz-Pfeiffer C. Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle // *Ann. Acad. N.Y. Sci.* – 2002. – **967**. – P. 146–157.
25. Wu D., Marko M., Claycombe K., Paulson K. E., Meydani S.N. Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-κB activity // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**. – P. 10983–10992.
26. Wu D., Meydani S.N. Mechanism of age-associated up-regulation in macrophage PGE2 synthesis // *Brain Behav. Immun.* – 2004. – **18**. – P. 487–494.