

... БИОХИМИЯ ... BIOCHEMISTRY ...

УДК: 612.35:612.444

Влияние мелипрамина на регуляцию L-тироксина содержания нейтральных липидов в клетках печени и мозга старых крыс В.В.Гарькавенко

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, НИИ биологии, отдел физиологии онтогенеза (Харьков, Украина)
Vladimir_garkavenko@ukr.net*

Исследовали особенности тиреоидной регуляции метаболизма холестерина и нейтральных липидов в клетках печени и мозга 24-месячных самцов крыс под влиянием 14-дневного введения специфического ингибитора кислой сфингомиелиназы мелипрамина. Показано, что мелипрамин эффективно модулирует соотношение сфинголипидов в печени и мозга крыс. Также показано, что в течение 24 часов тироксин индуцирует изменения в содержании нейтральных липидов и холестерина в клетках печени и коры больших полушарий головного мозга у животных, получавших мелипрамин. В то же время, животные контрольной группы резистентны к действию тироксина на содержание нейтральных липидов и холестерина. Таким образом, показана возможность модуляции тиреоидного ответа у старых животных посредством изменения соотношения сфинголипидов в клетках различных тканей.

Ключевые слова: тироксин, мелипрамин, старение, холестерин, нейтральные липиды, церамид, сфингомиелин.

Вплив меліпраміну на регуляцію L-тироксина вмісту нейтральних ліпідів в клітинах печінки і мозку старих щурів В.В.Гарькавенко

Досліджували особливості тиреоїдної регуляції метаболізму холестерину та нейтральних ліпідів в клітинах печінки і мозку 24-місячних самців щурів під впливом 14-денного введення специфічного інгібітору кислої сфінгомелінази меліпраміну. Показано, що меліпрамін ефективно модулює співвідношення сфінголіпідів у печінці та мозку щурів. Також показано, що протягом 24 годин тироксин індукуює зміни у вмісті нейтральних ліпідів та холестерину в клітинах печінки та кори великих півкуль головного мозку у тварин, які отримували меліпрамін. У той же час, тварини контрольної групи резистентні до дії тироксину на вміст нейтральних ліпідів та холестерину. Таким чином, показана можливість модуляції тиреоїдної відповіді у старих тварин за допомогою зміни співвідношення сфінголіпідів у клітинах різних тканин.

Ключові слова: тироксин, меліпрамін, старіння, холестерин, нейтральні ліпіди, церамід, сфінгомієлін.

Influence of imipramine on the L-thyroxine regulation of neutral lipid content in the brain and liver of old rats V.V.Garkavenko

Thyroid regulation of cholesterol and neutral lipids metabolism in the liver and brain of 24-month male rats under the influence of the 14-day specific acid sphingomyelinase inhibitor (imipramine) treatment was investigated. It has been shown that imipramine effectively modulates the ratio of sphingolipids in the liver and brain of rats. Also, it has been determined that within 24 hours thyroxine induces changes of neutral lipids and cholesterol content in the liver and cerebral cortex in imipramine treated animals. At the same time, animals of the control group are resistant to the thyroxine action on the neutral lipids and cholesterol content. Thus, a possibility of thyroid response modulation in old animals by changing sphingolipid ratio in various tissues has been demonstrated.

Key words: thyroxine, imipramine, aging, cholesterol, neutral lipids, ceramide, sphingomyelin.

Введение

Современными исследованиями показана важная роль сфинголипидов, и в частности сфингомиелина (СФМ) и его метаболита церамида (ЦЕР), в медиации многочисленных сигналов в

цитоплазме и на мембране клеток различных типов. СФМ и ЦЕР вовлечены в регуляцию таких процессов, как апоптоз, рецепция разнообразных гормональных сигналов, реструктуризация мембранных рафт и включенных в них трансмембранных белков, и многих других (Ипатова и др., 2006). Медиаторная роль ЦЕР в развитии апоптоза чрезвычайно важна, и ее нарушение может приводить к иммортализации клеток и, как следствие, к онкологии (Osawa et al., 2005; Kirschnek et al., 2000). В то же время показано, что накопление ЦЕР может быть сопряжено со многими патологиями, характерными для старческого возраста, как, например, болезнь Альцгеймера, резистентность к гормонам, в том числе к инсулину и тироксину (Hea et al., 2010; Babenko, Semenova, 2010). Таким образом, очевидно, что поддержание сфинголипидного баланса в клетках стареющего организма важно для сохранения их функциональной активности. В то же время, полагают, что повышенная активность ферментов группы сфингомиелиназ (СФМаз) в старости может приводить к избыточному накоплению ЦЕР в клетках различных тканей в результате чрезмерной деградации СФМ. Таким образом, в клеточной мембране достигается не только избыток ЦЕР, но и нарушение соотношения ЦЕР/СФМ, которое, как известно, определяет во многом структурно-функциональные свойства мембраны, и в частности организацию мембранных рафт (Babenko, Shakhova, 2006, 2008). Одним из возможных последствий изменения соотношения ЦЕР/СФМ на цитоплазматической мембране может являться резистентность мембранных рецепторов к краткосрочным воздействиям гормонов, в частности тироксина и инсулина. Нашими исследованиями уже была показана индуцированная ЦЕР резистентность к краткосрочным влияниям тироксина в клетках печени (Гарькавенко, 2010). Полагают, что гормон-резистентность возникает в результате подавления связанных с мембраной ферментов, принимающих участие в негеномной передаче гормонального сигнала избыточными количествами ЦЕР, который в норме растворяется в мембранных пулах СФМ и холестерина (ХС) (Castro et al., 2009; Summers, 2006). Связанный с СФМ и ХС церамид приводит рафты в сенсibiliзованное состояние, подготавливая мембрану к рецепции сигнала. В то же время, его избыток приводит к изменению структуры рафт и к нарушению не только тонких цитоплазматических путей передачи сигнала, но и к более долгосрочным эффектам резистентности (Hannun, Obeid, 2002). Для модуляции сфинголипидного баланса посредством подавления кислой СФМазы в современных исследованиях применяют специфический ингибитор этого фермента – трициклический антидепрессант меліпрамин. Под действием меліпрамина СФМазы лизосомальных компартментов выходят на внутреннюю поверхность лизосомальных мембран, где подвергаются действию протеолитических ферментов (Kornhuber et al., 2005; Deupree et al., 2007). Предполагают, что в старческом возрасте кислые СФМазы могут вносить особенно значительный вклад в развитие сфинголипидного дисбаланса, поэтому модуляция меліпрамином может оказаться эффективной в коррекции возрастных изменений соотношения ЦЕР/СФМ (Hea et al., 2010; Babenko, Shakhova, 2006). Эффективное ингибирование СФМазной активности, таким образом, позволяет предполагать улучшение рецепции и реализации гормональных сигналов в клетках. Особенно важными объектами исследования реставрации гормонального ответа в стареющем организме являются клетки печени, как основного органа метаболизма фармацевтических агентов и важнейшего регулятора обмена липидов в организме, и головной мозг, т.к. согласно современным исследованиям именно нарушение сфинголипидного баланса может играть ключевую роль в развитии различных возрастных нейродегенеративных патологий.

Целью данной работы было изучение возможностей модуляции возрастных нарушений ответа клеток печени и головного мозга старых крыс линии Вистар на действие тироксина посредством подавления активности кислой СФМазы.

Методы

Исследования выполнены на старых (24-месячных) самцах крыс линии Вистар. Подопытные животные получали внутримышечные инъекции меліпрамина (производство EGIS pharmaceuticals, Budapest) в дозе 10 мг/кг массы тела в течение 14 дней. Контрольная группа крыс в эти же сроки получала внутримышечно инъекцию 0,9% NaCl. Тироксин вводили внутривентриально в концентрации 200 мг/100 г массы тела за 24 часа до забоя. Животных декапитировали под эфирным наркозом. Экстракцию фосфолипидов из коры больших полушарий головного мозга и печени осуществляли по методу Bligh, Dyer (1959). Разделение липидов на фракции проводили методом одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля (пластины "Sorbfil", Россия). Пятна липидов определяли в парах йода и идентифицировали с помощью стандартов (Финдлей, Эванз, 1990). Количественное содержание сфинголипидов в хроматографических фракциях определяли по неорганическому фосфору методом Bartlett (1959). Содержание белка в суспензиях мозга и печени определяли по методу Lowry et al. (1951). Результаты экспериментов представлены как среднее арифметическое \pm

стандартная ошибка. Для сравнения данных содержания липидов контрольной и опытных групп использовали однофакторный дисперсионный анализ one-way Anova, и для сравнения содержания белка в опытных группах – t-критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что интактные клетки старых 24-месячных животных резистентны к ранним гормональным эффектам тироксина (Хассунех, 2006). Так, в экспериментах *in vitro* клетки печени старых животных проявляют резистентность к краткосрочным воздействиям тироксина на обмен нейтральных липидов, в то время как гепатоциты 3-месячных крыс чувствительны к действию гормона. Резистентность к действию тироксина была экспериментально моделирована на изолированных гепатоцитах 3-месячных крыс, путем введения в среду инкубации клеток короткоцепочечного С2 церамида, что свидетельствует о важной роли накопления ЦЕР в развитии нарушений краткосрочных эффектов тироксина (Гарькавенко, 2010). В то же время, предыдущими исследованиями отдела был продемонстрирован рост соотношения ЦЕР/СФМ в различных тканях старых животных (Babenko, Shakhova, 2006). Согласно современным исследованиям, такие изменения в соотношении сфинголипидов могут приводить к подавлению активности некоторых цитоплазматических путей, обеспечивающих гормональный ответ на ранних сроках его реализации (Radenne et al., 2008). Так, показано, что в экспериментах *in vivo* 24-часовое воздействие тироксина не вызывает изменения содержания нейтральных липидов в клетках печени старых крыс по сравнению с интактными животными, что, вероятно, может объясняться резистентностью клеток к ранним эффектам гормона, которые, как известно, помимо собственного вклада в гормональный ответ также сенсibiliзируют рецепторы к последующим воздействиям и подготавливают клеточное ядро к синтетическим процессам (Radenne et al., 2008).

Полагают, что нормализация содержания сфинголипидов в клетках печени и мозга старых животных, в частности снижение соотношения ЦЕР/СФМ, может способствовать нормальному развитию гормональных эффектов. Для снижения соотношения ЦЕР/СФМ в данной работе мы применяли мелипрамин, который, согласно современным исследованиям (Deupree et al., 2007), является специфическим ингибитором кислой СФМазы.

Настоящими исследованиями установлено, что в результате 14-дневного введения мелипрамина 24-месячным самцам крыс соотношение ЦЕР/СФМ в печени снизилось на 30%, а в коре больших полушарий головного мозга на 58,7% по отношению к контрольной группе животных (рис. 1), что свидетельствует об эффективности мелипрамина как модулятора содержания сфинголипидов в клетках старых животных. Падение содержания ЦЕР относительно СФМ свидетельствует о том, что длительное введение мелипрамина успешно ингибировало активность кислой СФМазы как в печени, так и в головном мозгу, что согласуется с данными литературы (Kornhuber et al., 2005). В деградации СФМ до ЦЕР помимо кислой СФМазы принимают участие также и нейтральные СФМазы, которые не ингибируются мелипрамином, поскольку его ингибирующий эффект распространяется только на ферменты, связанные с лизосомальными мембранами (Jenkins et al., 2010). Эффективная модуляция мелипрамином соотношения ЦЕР/СФМ, продемонстрированная в нашей работе, очевидно независима от активности нейтральных СФМаз и может происходить за счет повышения вклада СФМаз кислых лизосомальных компартментов в деградацию СФМ. Показано, что в старческом возрасте активность кислых СФМаз в различных тканях возрастает, и именно им отводится основная роль в развитии возрастного дисбаланса сфинголипидов (Hea et al., 2010; Babenko, Shakhova, 2006). Наши результаты также свидетельствуют в пользу предположения о ведущей роли кислых СФМаз.

Введение тироксина крысам, получавшим мелипрамин, вызвало изменение содержания нейтральных липидов в клетках, как печени, так и коры больших полушарий головного мозга, на фоне резистентности к действию гормона в контрольной группе (рис. 2). Под действием тироксина в печени крыс, получавших мелипрамин, происходит повышение содержания ХС на $15 \pm 0,5$ % по сравнению с контролем, а в коре больших полушарий головного мозга на $33,5 \pm 0,75$ %. Повышение содержания ХС, вероятно, происходит за счет усиления активности синтеза ХС на ранних этапах гормонального ответа, которое было ранее продемонстрировано в опытах на изолированных гепатоцитах молодых крыс под действием тироксина (Гарькавенко, 2010). Усиление синтеза ХС может способствовать кластеризации мембранных рафтов, а, следовательно, и сенсibiliзации рецепторов, функционально связанных с мембраной. Процессы реструктуризации мембраны посредством изменения содержания ХС универсальны для различных типов клеток и могут иметь место как в клетках печени, так и в нейронах головного мозга. Рост содержания триглицеридов (ТГ) в неокортексе под действием тироксина, на фоне неизменного содержания свободных жирных кислот (СЖК), может

свидетельствовать о депонировании новосинтезированных жирных кислот в ТГ, во избежание развития липотоксических эффектов СЖК на нейроны (Coleman, Lee, 2004). Повышение же содержания СЖК в клетках печени может обеспечиваться как синтетическими процессами, что также было продемонстрировано на изолированных клетках печени крыс различных возрастов, так и деградацией ТГ, уровень которых падает под действием гормона (Radenne et al., 2008). Изменение липидного состава мембран крайне важно для сенсibilизации мембраны как к дальнейшему воздействию тиреоидных гормонов, так и к действию других активных лигандов, в том числе, например, инсулина. ХС же, наряду со СФМ и ЦЕР, является важнейшим компонентом липидных рафт, причем современными исследованиями показана его важнейшая роль в сольбилизации микродоменов ЦЕР, образующихся в мембране при избытке последнего (Castro et al., 2009). Различная реакция пула нейтральных липидов клеток печени и головного мозга на воздействие тироксина в первую очередь может объясняться различиями в фармакокинетике меліпрамина в этих органах. Так, печень, как известно, является основным органом утилизации фармакологических агентов, в том числе и меліпрамина. В печени происходит образование активного метаболита дезметил-иміпрамина, в то время как головной мозг получает в основном иміпрамин, растворенный в плазме, концентрация которого, очевидно, меньше получаемой клетками печени и становится достаточной для обеспечения ингибиторной и антидепрессантной активности, начиная минимально с 7-дневного срока (Deurgee et al., 2007). Также следует учитывать влияние препарата на процессы поглощения нейромедиаторов в головном мозгу, что неизбежно сказывается на свойствах клеточных мембран нейронов и характере их ответа на любой гормональный стимул.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об индукции раннего гормонального ответа в клетках печени и коры больших полушарий головного мозга под действием специфического ингибирования кислой СФМазы. Возможность коррекции ответа на действие тироксина в клетках различных тканей путем изменения сфинголипидного баланса свидетельствует о важной роли, которую играют СФМ и его метаболиты в реализации эффектов тироксина, которые принято относить к сочетанным, ядерно-цитоплазматическим.

Также следует отметить, что наиболее вероятным путем проведения тиреоидного сигнала в цитоплазме клеток различных тканей, согласно литературным данным, является фосфоинозитидзависимый сигнальный путь, антагонистом которого является ЦЕР, что позволяет предположить важную роль этого сигнального пути в коррекции гормонального ответа в настоящей работе (Radenne et al., 2008).

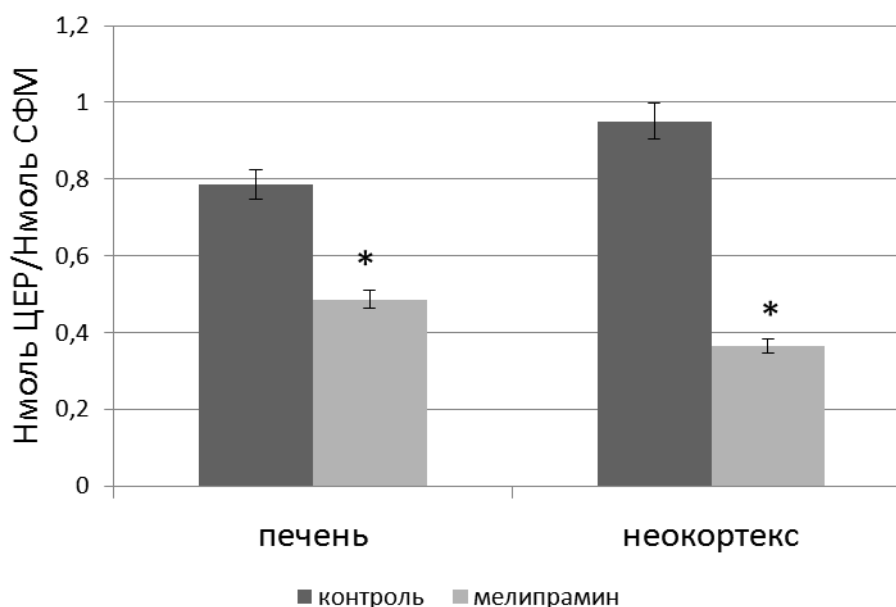


Рис. 1. Влияние меліпрамина на изменение соотношения между ЦЕР и СФМ в печени и коре больших полушарий головного мозга 24-месячных крыс (нмоль/нмоль)

Примечание: * $P < 0,05$.

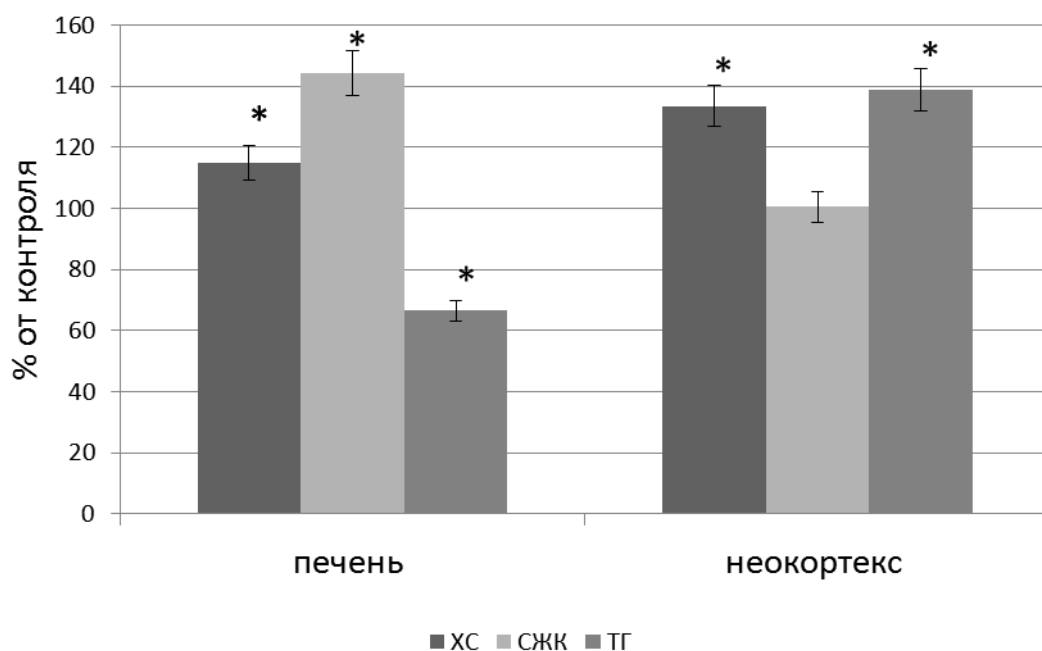


Рис. 2. Влияние мелипрамина на краткосрочную регуляцию L-тироксинем содержания нейтральных липидов в клетках печени и коры больших полушарий головного мозга старых крыс

*Примечание: * P<0,05.*

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о реконструкции под действием специфического ингибитора кислой СФМазы ответа на действие тироксина в гормон-резистентных клетках старых животных, вследствие подавления деградации СФМ, а также, вероятно, в результате снятия ингибирующего эффекта повышенных концентраций ЦЕР на активность цитоплазматических путей передачи тиреоидного сигнала.

Список литературы

- Гарькавенко В.В. Вплив цераміду на короткострокову регуляцію тироксином вмісту нейтральних ліпідів і холестерину у ізольованих гепатоцитах 3-місячних щурів // Фізіол. журн. – 2010. – Т.56, №2. – С.187. /Gar'kavenko V.V. Vplyv tseramidu na korotkostrokovu regulyatsiyu tyroksynom vmistu neytral'nykh lipidiv i kholesterynu u izolyovanykh hepatotsytakh 3-misyachnykh shchuriv // Fiziol. zhurn. – 2010. – T.56, №2. – S.187./
- Ипатова О.М., Торховская Т.И., Захарова Т.С. и др. Сфинголипиды и клеточная сигнализация: участие в апоптозе и атерогенезе // Биохимия. – 2006. – Т.71, вып.7. – С. 882–893. /Ipatova O.M., Torkhovskaya T.I., Zakharova T.S. i dr. Sphingolipidy i kletchnaya signalizatsiya: uchastiye v apoptoze i aterogeneze // Biokhimiya. – 2006. – T.71, vyp.7. – S. 882–893./
- Финдлей Дж.Б., Эванз У.Г. Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 424с. /Findley Dzh.B., Evanz U.G. Biologicheskiye membrany. Metody: Per. s angl. – M.: Mir, 1990. – 424s./
- Хассунех Л.Х.М. Влияние α-токоферола на индукцию L-тироксинем обмена липидов в печени старых крыс // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2006. – Вып.3, №729. – С. 287–290. /Khassunekh L.Kh.M. Vliyaniye α-tokoferola na induktsiyu L-tiroksynom obmena lipidov v pecheni starykh krysh // Visnyk Kharkivs'kogo natsional'nogo universytetu imeni V.N.Karazina. Seriya: biologiya. – 2006. – Vyp.3, №729. – S. 287–290./
- Babenko N.A., Semenova Y.A. Effects of long-term fish oil-enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats // Exp. Gerontol. – 2010.– Vol.45, №5. – P. 375–380.
- Babenko N.A., Shakhova E.G. Effects of Chamomilla recutita flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats // Exp. Gerontology. – 2006. – Vol.41, №1. – P. 32–39.
- Babenko N.A., Shakhova E.G. Effects of flavonoids on sphingolipid turnover in the toxin-damaged liver and liver cells // Lipids Health Dis. – 2008. – Vol.7, №1. – P. 1–11.
- Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography // J. Biol. Chem. – 1959. – Vol.234, №3. – P. 466–468.

- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – Vol.37, №8. – С. 911–917.
- Castro B.M., Silva L.C., Fedorov A. et al. Cholesterol-rich fluid membranes solubilize ceramide domains: implications for the structure and dynamics of mammalian intracellular and plasma membranes // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol.284, №34. – P. 22978–22987.
- Coleman R.A., Lee D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation // *Progress in Lipid Research.* – 2004. – №43. – P. 134–176.
- Deupree J.D., Reed A.L., Bylund D.B. Differential effects of the tricyclic antidepressant, desipramine, on the density of adrenergic receptors in juvenile and adult rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol.321, №2. – P. 770–776.
- Hannun Y.A., Obeid L.M. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol.277, №29. – P. 25847–25850.
- Hea X., Huangb Y., Lib B. et al. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease // *Neur. Biol. Ageing.* – 2010. – Vol.31, №3. – P. 398–408.
- Jenkins R.W., Canals D., Idkowiak-Baldys J. et al. Regulated secretion of acid sphingomyelinase – implications for selectivity of ceramide formation // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol.285, №46. – P. 35706–35718.
- Kirschnek S., Paris F., Weller M. et al. CD95-mediated apoptosis in vivo involves acid sphingomyelinase // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol.275, №35. – P. 27316–27323.
- Kornhuber J., Medlin A., Bleich S. et al. High activity of acid sphingomyelinase in major depression // *J. Neural. Transm.* – 2005. – Vol.112. – P. 1583–1590.
- Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193. – P. 365–375.
- Osawa Y., Uchinami H., Bielawski J. et al. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- α // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol.280, №30. – P. 27879–27887.
- Radenne A., Akpa M., Martel C. et al. Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: evidence for T3 genomic and nongenomic actions // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2008. – Vol.295, №4. – P. 884–894.
- Summers S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity // *Prog. Lipid Res.* – 2006. – Vol.45, №1. – P. 42–72.

Представлено: Л.А.Бондаренко / Presented by: L.A.Bondarenko

Рецензент: В.В.Мартиненко / Reviewer: V.V.Martynenko

Подано до редакції / Received: 29.04.2011.