

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...
... PHYSIOLOGY OF HUMAN AND ANIMALS ...

УДК: 577.115:[591.143+611.73]:612.65

Возрастные особенности содержания фосфолипидов, свободных жирных кислот и нейтральных липидов в сыворотке крови и скелетной мускулатуре самцов крыс линии *Wistar*
Н.А.Бабенко, О.А.Тимофійчук*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)*
olga.timofijchuk@gmail.com

Основными факторами риска развития таких метаболических расстройств, как инсулинорезистентность и сахарный диабет 2 типа, являются ожирение и изменение метаболизма липидов. Целью настоящей работы было изучение возрастных особенностей содержания фосфолипидов, свободных жирных кислот и нейтральных липидов в сыворотке крови и скелетной мускулатуре (диафрагме, икроножной и камбаловидной мышцах) самцов крыс 3-, 12-, 24-, 28- и 32-месячного возраста. Было отмечено, что в процессе старения на фоне снижения содержания общего белка и неизменности уровня общих липидов масса скелетных мышц достоверно снижается в сравнении со зрелыми животными. Также нами было установлено, что на поздних стадиях постнатального онтогенеза наблюдается снижение базальных уровней фосфолипидов и накопление свободных жирных кислот и нейтральных липидов (за счет ди- и триацилглицеролов), причем наиболее выраженное снижение содержания фосфолипидов было отмечено в сыворотке крови, а аккумуляция свободных жирных кислот и нейтральных липидов – и в сыворотке, и в диафрагме. Полученные результаты могут свидетельствовать о связанных со старением липид-индуцированных нарушениях в сигналинге инсулина.

Ключевые слова: *нейтральные липиды, диацилглицерол, триацилглицерол, свободные жирные кислоты, фосфолипиды, скелетная мускулатура, инсулинорезистентность, старение.*

Вікові особливості вмісту фосфоліпідів, вільних жирних кислот і нейтральних ліпідів у сироватці крові та скелетній мускулатурі самців щурів лінії *Wistar*
Н.О.Бабенко, О.О.Тимофійчук

Одними з основних факторів ризику розвитку метаболічних розладів, таких як інсулінорезистентність і цукровий діабет 2 типу, є ожиріння і порушення метаболізму ліпідів. Метою даної роботи було дослідження вікових особливостей вмісту фосфоліпідів, вільних жирних кислот і нейтральних ліпідів у сироватці крові та скелетній мускулатурі (діафрагмі, ікроножному та камбаловидному м'язі) самців щурів 3-, 12-, 24-, 28- і 32-місячного віку. Було продемонстровано, що в процесі старіння на фоні зниження вмісту загального білка та незмінності рівня загальних ліпідів маса скелетних м'язів вірогідно знижується в порівнянні зі зрілими тваринами. Також нами було встановлено, що на пізніх стадіях постнатального онтогенезу спостерігається зниження базальних рівнів фосфоліпідів і накопичення вільних жирних кислот та нейтральних ліпідів (за рахунок ді- та триацилглицеролів), до того ж найбільш виражене зниження вмісту фосфоліпідів було відмічено у сироватці крові, а аккумуляція вільних жирних кислот та нейтральних ліпідів – як у сироватці крові, так і у діафрагмі. Отримані результати можуть свідчити про пов'язані зі старінням ліпід-індуковані порушення у ланках сигналіngu інсуліну.

Ключові слова: *нейтральні ліпіди, діацилглицерол, триацилглицерол, вільні жирні кислоти, фосфоліпіди, скелетна мускулатура, інсулінорезистентність, старіння.*

Age features of the phospholipids, free fatty acids and neutral lipids content in serum and skeletal muscle of male Wistar rat N.A.Babenko, O.A.Timofiychuk

Obesity and lipid metabolism alterations are risk factors for metabolic disorders including insulin resistance and diabetes mellitus type 2. The age-specific features of phospholipids, free fatty acids and neutral lipids content in serum and skeletal muscle (diaphragm, gastrocnemius and soleus muscles) of 3-, 12-, 24-, 28- and 32-month-old male rats have been investigated. It has been shown that muscle weight significantly decreases with total protein content reduction and total lipid level constancy at aging as compared with mature rats. It has been demonstrated that phospholipids content is decreased and free fatty acids and neutral lipids (di- and triacylglycerol) levels are increased in studied rat tissues at the late stage of postnatal ontogenesis. The most marked phospholipids basal levels reduction was observed in serum, whereas free fatty acids and neutral lipids accumulation – in serum and diaphragm. Results obtained, probably, indicate the link between aging and lipid-induced changes in insulin signaling.

Key words: *neutral lipids, diacylglycerol, triacylglycerol, free fatty acids, phospholipids, skeletal muscle, insulin resistance, aging.*

Введение

Скелетная мускулатура (СМ) является важным элементом опорно-двигательного аппарата, составляя около 40–45 % от массы тела взрослого человека (Corcoran et al., 2007; Lahoute et al., 2008). При этом у млекопитающих она выполняет не только локомоторную функцию, но и является как основным белковым депо организма, так и главным сайтом утилизации липидов (Cortright et al., 1997; Kelley et al., 2001). Кроме того, данный тип ткани занимает центральное место в индуцированном инсулином поглощении глюкозы, поскольку скелетные мышцы являются одной из главных мишеней действия данного панкреатического гормона (Corcoran et al., 2007; deFronzo et al., 1981; Shulman et al., 2000; Zendzian-Piotrowska et al., 1999).

Известно, что процесс старения человека и животных часто сопровождается снижением функциональной активности СМ, развивающимся на фоне изменения метаболизма липидов (Фролькис, 1989; Navarro et al., 2001). Так, установлено, что в процессе позднего постнатального онтогенеза происходит падение скорости ацильного обмена (Kelley et al., 2001), изменение жирнокислотного состава липидов различных субклеточных фракций (Clare et al., 1998), снижение β -окисления жирных кислот (ЖК) (Toth, Tchernof, 2000). Важной причиной этих изменений считают снижение в старости экспрессии в СМ рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR α), являющихся факторами ядерной транскрипции (Coll et al., 2006). PPAR α модулируют экспрессию генов, включенных в окисление ЖК и метаболизм липопротеинов. Полагают, что перегрузка нежировых тканей липидами приводит к клеточной дисфункции, гибели (липоапоптозу) клеток и потере функциональной массы тканей (Navarro et al., 2001; Lahoute et al., 2008). Кроме того, ряд исследователей (Ergen et al., 2005; Corcoran et al., 2007) считают, что изменение содержания и метаболизма липидов в СМ человека и животных может лежать в основе развития таких патологических состояний организма, как инсулинорезистентность (ИР) и сахарный диабет 2 типа (СД2Т), наиболее часто возникающих в пожилом возрасте и в старости.

Ряд исследований (Kelley et al., 2001; Boden et al., 2001), направленных на изучение вышеуказанных патологий, указывает на накопление в мышцах свободных ЖК (СЖК), которые являются предшественниками диацилглицеролов (ДАГ) и триацилглицеролов (ТАГ). Поэтому полагают, что аккумуляция СЖК ассоциирована с развитием состояния резистентности к действию инсулина не только в СМ, но и во всем организме. Было предположено, что ТАГ действует как маркер, свидетельствующий о присутствии других, более метаболически активных липидных мессенджеров, которые напрямую связаны с нарушениями в сигналинге инсулина (Shulman, 2000). Одним из таких липидных посредников является ДАГ, уровень которого существенно повышается при данной патологии (Yu et al., 2002; Itani et al., 2002; Kim et al., 2001). Предполагают, что ДАГ индуцирует ИР, активируя ДАГ-чувствительную протеинкиназу С (ПКС), которая, в свою очередь, фосфорилирует как рецептор инсулина, так и субстрат инсулинового рецептора (IRS-1), тем самым нарушая сигналинг инсулина (Montell et al., 2001; Lin et al., 2001). Однако содержание данных липидов в различных морфофункциональных типах скелетных мышц в процессе нормального старения здоровых человека и животных изучено мало.

Таким образом, принимая во внимание важную роль липидов в снижении функциональной активности СМ и развитии таких заболеваний, как ИР и СД2Т, риск возникновения которых значительно повышается с возрастом, и учитывая малоизученность содержания липидов в скелетных мышцах в различные возрастные периоды и, в частности, в процессе старения здорового человека и животных, целью настоящей работы было изучение возрастных особенностей изменения содержания фосфолипидов (ФЛ), СЖК и нейтральных липидов (НЛ) сыворотки крови и СМ крыс.

Объекты и методы исследования

В работе использовали интактных самцов крыс линии Wistar 3-, 12-, 24-, 28- и 32-месячного возраста, содержащихся в стандартных условиях вивария НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина. Животных, наркотизированных диэтиловым эфиром, декапитировали. Затем из брюшной полости извлекали диафрагму, с задних конечностей выделяли камбаловидную и икроножную мышцу. С тканей удаляли видимый жир и фасцию. После этого ткани замораживали в жидком азоте и гомогенизировали.

Липиды из гомогената мышечной ткани экстрагировали по методу Bligh и Dyer (Bligh, Dyer, 1959). Фракционирование индивидуальных представителей липидов проводили методом одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля (ЛСЛ 254 – 5/40μ, Chemapol) в системе растворителей: гексан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота (73:25:2, об/об) для НЛ, СЖК и общих ФЛ (Кейтс, 1975). Пятна липидов проявляли в парах йода и идентифицировали, сравнивая со стандартами. Количественное определение содержания липидов в пробах проводили по методу March и Weinstein (March, Weinstein, 1966), содержание белка – методом Lowry и соавторов (Lowry et al., 1951). Данные в таблицах представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка. Для сравнения полученных данных использовали одно- и двухфакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено достоверное увеличение массы исследуемых морфофункциональных типов СМ крыс к 12-месячному возрасту по сравнению с 3-месячными животными (рис. 1). Однако у старых животных (24–32 месяца) значения как относительной, так и абсолютной массы диафрагмы, икроножной и камбаловидной мышц достоверно снижаются в сравнении со зрелыми крысами. Таким образом, на поздних стадиях постнатального онтогенеза наблюдается потеря массы исследуемых типов СМ, что является характерным признаком физиологического старения организма. Несмотря на то, что общая тенденция изменения массы различных типов СМ в онтогенезе однотипна, следует отметить, что наиболее выраженные изменения массы характерны для диафрагмы и икроножной мышцы.

Согласно литературным данным (Монастирський, 2007), главным результатом возрастного развития организма является изменение в разные периоды жизни мышечной массы, что приводит к соответствующим изменениям уровня функциональных возможностей СМ и всего организма, а именно: в период становления и роста организма масса тканей постепенно увеличивается с соответствующим повышением уровня их функциональных возможностей, в зрелом возрасте она относительно стабильна, а начиная с пожилого возраста масса СМ постепенно, но неуклонно уменьшается, что сопровождается снижением уровня их функциональной активности. Так и в данном исследовании была продемонстрирована данная общебиологическая закономерность направленности развития СМ в постнатальном онтогенезе крыс.

Возможными причинами снижения массы СМ в позднем постнатальном онтогенезе являются: уменьшение размера мышечных волокон, количества двигательных единиц, снижение активности белкового синтеза (Zhong et al., 2007), в результате чего наблюдается ухудшение не только структурно-морфологических характеристик СМ, но и ее функциональных свойств, таких как возбудимость, проводимость, сократимость и эластичность, что, в свою очередь, вызывает снижение величин силы сокращения, работы, которую совершает мышца, мощности, развиваемой ею при работе, а также ее выносливости (Williams et al., 2002; Navarro et al., 2001). Весь этот комплекс атрофических дегенеративных изменений СМ, именуемый саркопенией, является характерным признаком физиологического старения организма. Множество исследователей полагают, что саркопениея наряду с малоподвижным образом жизни может способствовать развитию ожирения, которое является основным фактором риска развития ИР и СД2Т (Hulver et al., 2003).

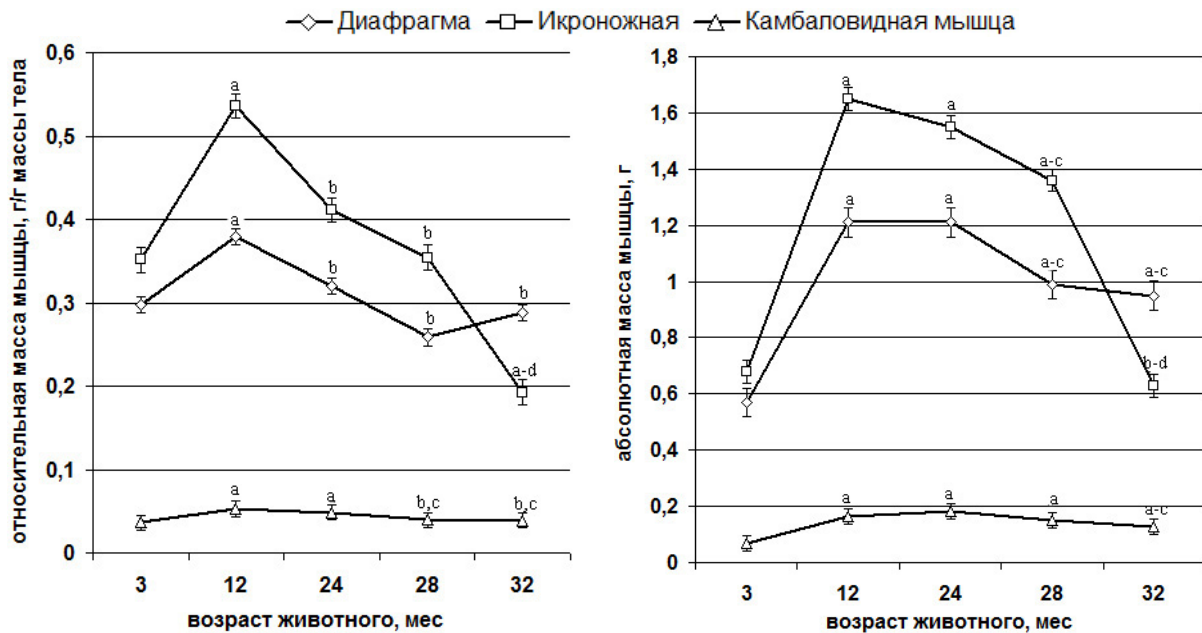


Рис. 1. Возрастные изменения массы СМ

Примечания: а – достоверно по отношению к животным 3-месячного возраста, b – достоверно по отношению к животным 12-месячного возраста, с – достоверно по отношению к животным 24-месячного возраста, d – достоверно по отношению к животным 28-месячного возраста, $p < 0,05$.

Как известно, скелетные мышцы млекопитающих содержат в своем составе: 72–80 % воды; 16–20 % белков; 0,9–2,2 % небелковых азотистых соединений (креатин, креатинфосфат, АТФ, АДФ, аминокислоты и т.д.); безазотистые органические соединения (гликоген, фосфолипиды, холестерин и т.д.); минеральные элементы (Navarro et al., 2001). Полагают, что снижение активности белкового синтеза в процессе постнатального онтогенеза является одной из основных причин изменения мышечной массы. Результаты количественного определения содержания белка в гомогенатах скелетных мышц отражают вышеуказанные особенности изменения массы исследуемых типов СМ (рис. 2).

Нашими исследованиями было показано, что содержание общего белка в СМ достоверно повышается у 12-месячных животных по сравнению с молодыми крысами. После чего уровень белка оставался неизменным во всех изученных типах СМ. Однако в старости было продемонстрировано достоверное снижение количественного содержания белка в диафрагме и икроножной мышце 28- и 32-месячных крыс, а в камбаловидной мышце – только 32-месячных по сравнению с крысами 12- и 24-месячного возраста. Важно отметить, что наиболее выраженные изменения содержания белка были выявлены в икроножной мышце. Возможно, данный факт может служить объяснением тому, что именно для икроножной мышцы было характерно наиболее интенсивное изменение массы. Таким образом, учитывая тот факт, что уровень общих липидов в изучаемых типах скелетных мышц с возрастом остается неизменным (табл. 1), можно предположить, что изменение содержания белка в СМ является одной из основных причин возрастных изменений мышечной массы.

Однако были отмечены достоверные изменения содержания различных типов липидных биомолекул в СМ животных на разных этапах постнатального онтогенеза. Настоящим исследованием установлено достоверное снижение содержания ФЛ в гомогенатах различных типов мышечных тканей (табл. 2) к 24-месячному возрасту, а в сыворотке крови – к 12-месячному возрасту по сравнению с молодыми животными. В последующие периоды онтогенеза (вплоть до глубокой старости) базальный уровень ФЛ остается неизменным в скелетных мышцах, тогда как в сыворотке крови отмечается достоверное снижение ФЛ на 18% у животных 32-месячного возраста по сравнению с 28-месячными крысами. Как оказалось, наиболее выраженное снижение уровня ФЛ было отмечено в сыворотке крови, поскольку у старых, 32-месячных животных содержание общих ФЛ снизилось в 2

раза по сравнению с молодыми животными. Тогда как изменения содержания данных липидов в СМ выражены в меньшей степени.



Рис. 2. Содержание белка в скелетных мышцах крыс

Примечания: *a* – достоверно по отношению к животным 3-месячного возраста, *b* – достоверно по отношению к животным 12-месячного возраста, *c* – достоверно по отношению к животным 24-месячного возраста, *d* – достоверно по отношению к животным 28-месячного возраста, $p < 0,05$.

Таблица 1.

Содержание общих липидов в сыворотке крови и в скелетных мышцах крыс

Возраст, мес.	Сыворотка	Диафрагма	Икроножная	Камбаловидная
3	217,89±4,97	76,29±2,07	58,11±1,36	39,32±1,30
12	193,73±5,16	73,21±0,63	56,70±1,17	36,05±0,46
24	182,89±6,13	72,33±2,08	42,91±1,06	35,46±0,66
28	198,60±5,67	79,73±1,75	45,14±0,81	35,63±0,47
32	191,35±2,62	99,65±1,58	49,05±0,79	38,49±0,49

Примечание: данные представлены в нмоль/мг белка.

Согласно данным литературы, снижение уровня ФЛ в мембранах различных типов старых клеток наблюдается в результате интенсификации процессов их перекисного окисления, сопровождающегося повышением в мембранах уровня гидропероксида фосфатидилхолина (ФХ) (Clore et al., 1998). Также одной из важных причин уменьшения содержания ФЛ в клетках при старении является нарушение их биосинтеза вследствие снижения активности ключевых ферментов синтеза ФХ и фосфатидилэтаноламина, составляющих 70–75 % всех ФЛ клеточных мембран СМ (Zendzian-Piotrowska et al., 1999). Полагают, что указанные изменения метаболизма ФЛ в старости модулируют физико-химические свойства плазматических мембран, что является одной из ключевых причин снижения текучести липидного бислоя. Последнее вызывает нарушение связывания инсулина с рецепторами на клеточных мембранах и/или ослабление его действия (Yu et al., 2002).

В результате проведенных исследований было установлено, что содержание НЛ, в отличие от общих ФЛ, возрастает во всех исследуемых нами типах тканей на всех рассмотренных этапах постнатального онтогенеза и в глубокой старости (32 месяца) – практически в 2 раза выше, чем у молодых животных (табл. 2). Но накопление с возрастом НЛ в сыворотке крови начинается уже в 12-

месячном возрасте, тогда как в скелетных мышцах – только на 24 месяце постнатального онтогенеза. Таким образом, несмотря на то, что изучаемые ткани существенно отличаются по содержанию общих ФЛ и НЛ в разные периоды онтогенеза, общая направленность изменения их базальных уровней (снижение ФЛ и увеличение НЛ) в процессе старения характерна как для сыворотки крови, так и для СМ.

Таблица 2.

Содержание липидов в сыворотке крови и скелетных мышцах крыс

Липид	Возраст, мес.	Сыворотка	Диафрагма	Икроножная	Камбаловидная
ФЛ	3	159,68±4,89	47,73±1,97	44,52±1,43	28,46±1,12
	12	124,21±4,43 ^a	41,88±0,55	42,01±1,19	24,89±0,45
	24	96,94±2,95 ^{a,b}	29,28±1,15 ^{a,b}	27,24±1,03 ^{a,b}	18,66±0,48 ^{a,b}
	28	97,41±4,16 ^{a,b}	31,24±1,12 ^{a,b}	28,04±0,81 ^{a,b}	17,81±0,42 ^{a,b}
	32	79,79±3,16 ^{a-d}	33,15±0,87 ^{a,b}	28,75±0,81 ^{a,b}	18,33±0,37 ^{a,b}
НЛ	3	55,61±0,95	27,27±0,50	12,76±0,19	9,98±0,24
	12	66,30±1,23 ^a	30,19±0,47	13,77±0,25	10,20±0,12
	24	81,85±3,58 ^{a,b}	41,62±1,60 ^{a,b}	14,72±0,19 ^a	15,81±0,17 ^{a,b}
	28	96,59±1,89 ^{a-c}	46,82±1,29 ^{a-c}	16,03±0,17 ^{a,b}	16,66±0,13 ^{a-c}
	32	106,47±1,46 ^{a-d}	64,19±1,41 ^{a-d}	18,99±0,17 ^{a-d}	18,76±0,21 ^{a-d}

Примечания: данные представлены в нмоль/мг белка; а – достоверно по отношению к животным 3-месячного возраста, b – достоверно по отношению к животным 12-месячного возраста, c – достоверно по отношению к животным 24-месячного возраста, d – достоверно по отношению к животным 28-месячного возраста, $p < 0,05$.

В данной работе показано, что с возрастом и, в частности, в процессе старения наблюдается постепенное накопление предшественников НЛ – СЖК в исследуемых нами типах тканей (рис. 3). Так, повышение уровня СЖК отмечено в сыворотке крови и диафрагме 12-месячных крыс, а также – в икроножной и камбаловидной мышцах 24-месячных животных в сравнении с 3-месячными крысами. Следует отметить, что наиболее выраженные изменения содержания СЖК в процессе старения наблюдались в сыворотке крови и диафрагме, что объясняется тем, что в данных типах тканей животных 32-месячного возраста базальный уровень СЖК в 2 раза выше, чем у молодых животных. В то же время, в других морфофункциональных типах скелетных мышц возрастные изменения содержания СЖК менее выражены.

Увеличение базальных уровней СЖК в сыворотке крови и СМ крыс в позднем постнатальном онтогенезе отмечено многими исследователями (Фролькис, 1992; Unger, 2002). Установлено снижение в старости интенсивности включения ЖК в ФЛ различных типов клеток, происходящее на фоне замедления окисления ЖК в тканях и угнетения процессов реакцирования. Также показано повышение с возрастом активности фосфолипазы А2 (Toth, Tchernof, 2000), что, наряду с вышеуказанным, может являться важной причиной накопления СЖК в старости. Кроме того, R.H.Unger (Unger, 2002) полагает, что избыточное накопление СЖК в клетках неадипозных тканей в старости может быть результатом их возрастной резистентности к действию лептина – гормона, физиологическая роль которого заключается в регуляции гомеостаза липидов в неадипозных тканях. Автор считает, что резистентность клеток к действию лептина индуцирует накопление липидов в клетках неадипозных тканей и липотоксичность, что приводит к развитию ИР. Последнее, в свою очередь, приводит к нарушению синтеза ЖК, что может сопровождаться извлечением депонированных ЖК из адипозных тканей и дальнейшим повышением их уровня в плазме крови. Кроме того, высокий уровень СЖК в сыворотке крови старых животных может свидетельствовать об интенсивном липолизе в висцеральных адипоцитах.

Coll и соавторы (Coll et al., 2006) предполагают, что повышенные уровни СЖК приводят к увеличению содержания ТАГ и ДАГ в СМ. Так и в настоящем исследовании было продемонстрировано, что с возрастом в исследуемых тканях наблюдается накопление ДАГ (рис. 4.1). Достоверное повышение содержания данного липида в сыворотке крови и диафрагме было показано у животных уже на 12 месяце постнатального онтогенеза, тогда как в икроножной и камбаловидной

мышцах – только у 24-месячных животных по сравнению с молодыми крысами. Важно отметить, что в процессе старения (24–32 месяца) продолжалось накопление ДАГ в сыворотке крови и диафрагме, в то время как в мышцах задних конечностей старых крыс (28 месяцев) базальные уровни липида оставались неизменными по сравнению с 24-месячными животными. Но на 32 месяце постнатального онтогенеза содержание ДАГ в данных типах скелетных мышц было значительно выше в сравнении с 28-месячными животными. Также следует отметить, что наиболее сильные возрастные изменения содержания ДАГ отмечены в сыворотке крови, поскольку уровень ДАГ в сыворотке крови 32-месячных крыс более чем в 3 раза превышает данный показатель 3-месячных животных. В то время как среди исследуемых типов СМ наиболее выраженное накопление ДАГ было характерно для диафрагмы, где содержание липида у животных 32-месячного возраста увеличилось в 2,5 раза по сравнению с молодыми крысами.



Рис. 3. Возрастные изменения содержания СЖК в тканях крыс разного возраста

Примечания: *a* – достоверно по отношению к животным 3-месячного возраста, *b* – достоверно по отношению к животным 12-месячного возраста, *c* – достоверно по отношению к животным 24-месячного возраста, *d* – достоверно по отношению к животным 28-месячного возраста, $p < 0,05$.

Многими исследованиями (Venable et al., 1994; Vanno, 2002; Gomez-Cambronero, 2010) было показано, что увеличение базального уровня ДАГ характерно для ряда клеток и тканей старых животных и патологических состояний человека, возникающих в пожилом возрасте и старости. Как известно, важными эффекторными молекулами ДАГ являются различные изоформы ПКС, которые, фосфорилируя эффекторные белки, регулируют ионный транспорт, секрецию, транскрипцию генов, метаболизм, рост клеток и многие другие физиологические процессы (Itani et al., 2002). Хроническое увеличение ДАГ в мышечных клетках приводит к значительному увеличению активности ДАГ-зависимых ПК с последующим падением уровня данных эффекторных белков в клетках. Характерной особенностью данных клеток является развитие состояния резистентности к действию различных гормонов, множественных нарушений метаболизма и их преждевременное старение (Nishizuka, 1995).

Кроме того, Turinsky и соавт. предположили, что повышение содержания ДАГ приводит к активации ПКС, фосфорилирующей как рецептор инсулина, так и IRS-1, нарушая, тем самым, проведение сигнала инсулина (Turinsky et al., 1990; Itani et al., 2002). Кроме того, ДАГ может активировать сфингомиелиназы и провоцировать образование церамида (Yen et al., 1999), который подавляет активность цитидилтрансферазы – ключевого фермента синтеза ФХ, в результате чего уровень ДАГ, являющихся предшественниками синтеза ФХ, возрастает (см. рис. 4.1), а содержание

ФЛ снижается (см. табл. 2). Церамид, в свою очередь, ингибирует вызванную инсулином транслокацию ПКВ в мембраны (Schimtz-Peiffer et al., 1999). Также данный липид ингибирует ФЛД, связываясь с каталитическим ядром фермента либо за счет нарушения связывания липазы с кофакторами (например, фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом и Rho) (Mansfield et al., 2004). Таким образом, церамид приводит к нарушениям в звеньях сигналинга инсулина, необходимых для регуляции стимулированного гормоном поглощения и метаболизма глюкозы во всех тканях-мишенях, в том числе и в СМ.

■ Сыворотка □ Диафрагма ▨ Икроножная ▩ Камбаловидная мышца

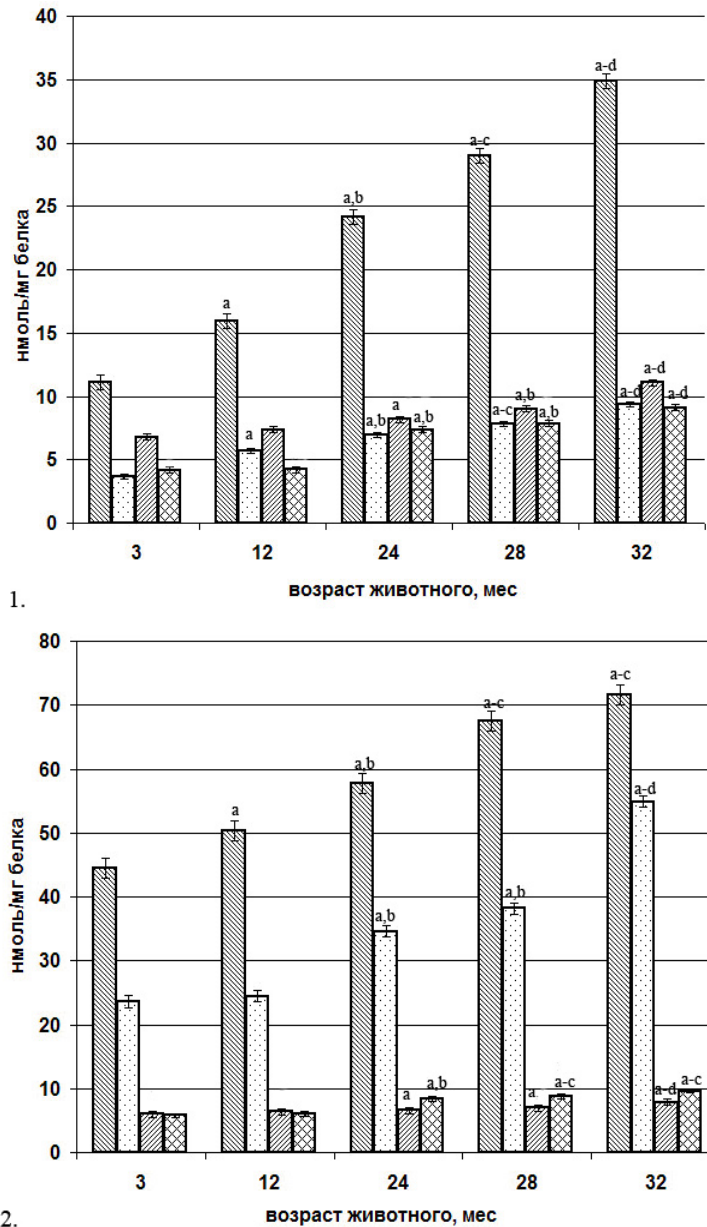


Рис. 4. Возрастные изменения содержания НЛ в тканях крыс разного возраста

Примечания: 1. ДАГ; 2. ТАГ; a – достоверно по отношению к животным 3-месячного возраста, b – достоверно по отношению к животным 12-месячного возраста, c – достоверно по отношению к животным 24-месячного возраста, d – достоверно по отношению к животным 28-месячного возраста, $p < 0,05$.

Также в результате данного исследования было установлено, что с возрастом в сыворотке крови и СМ возрастает содержание ТАГ (рис. 4.2). В сыворотке крови достоверное повышение содержания ТАГ было отмечено уже на 12 месяце постнатального онтогенеза и было характерным и для последующих стадий постнатального развития, вплоть до глубокой старости. У старых животных (24 месяца) наблюдается достоверное повышение содержания ТАГ во всех исследуемых морфофункциональных типах скелетных мышц по сравнению с молодыми животными. Неизменные базальные уровни липида были характерны для диафрагмы и икроножной мышцы 28-месячных животных по сравнению с 24-месячными. Но в старости (32 месяца) было показано дальнейшее накопление ТАГ. Причем наиболее интенсивным процесс аккумуляции ТАГ был в диафрагме, поскольку базальный уровень липида 32-месячных животных превышал данный показатель 3-месячных крыс более чем в 2 раза.

Как было ранее установлено, синтез ТАГ катализируется ДАГ-ацилтрансферазой, которая катализирует перенос ЖК с ацил-СоА на ДАГ (содержание которых в позднем постнатальном онтогенезе значительно повышается – см. рис. 4.2), тем самым продуцируя образование ТАГ (Kelley et al., 2002). ТАГ – относительно инертные молекулы, изменение содержания которых представляет собой маркер, свидетельствующий об аккумуляции других более метаболически активных липидов в СМ, в частности таких, как: церамиды, ДАГ и длинноцепочечные ацил-СоА, которые более эффективно отражают чувствительность тканей к действию инсулина, чем ТАГ (Kelley et al., 2002). Они являются активными формами СЖК и функционируют как источник вторичных мессенджеров, таких как ДАГ или церамид, тем самым принимая участие в сигналинге инсулина в СМ (Kim et al., 2001). Sorcogan и соавторы (Sorcogan et al., 2007) полагают, что повышение содержания ТАГ ассоциировано с нарушениями в проведении сигнала инсулина. А последнее, как известно, способствует развитию ИР и СД2Т, вероятность развития которых существенно возрастает в старости.

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что основной прирост массы различных морфофункциональных типов СМ и максимальные значения содержания белка в них приходится на первый год постнатального онтогенеза. Однако у старых животных абсолютная масса диафрагмы и икроножной мышцы достоверно снижается в возрасте 28 и 32 месяцев, в то время как камбаловидной – только в 32-месячном возрасте в сравнении с 24-месячными крысами. Важно отметить, что, на фоне неизменности уровня общих липидов в скелетных мышцах, возрастные особенности содержания белка отражают изменения абсолютной массы тканей с возрастом. Также было отмечено достоверное снижение содержания ФЛ и повышение базальных уровней СЖК и НЛ (за счет аккумуляции ДАГ и ТАГ) в сыворотке крови и в скелетных мышцах в процессе старения. Несмотря на единую направленность возрастных изменений в содержании липидов, в работе были выявлены особенности, характерные для различных типов мышц и сыворотки крови. Наиболее выраженное снижение содержания ФЛ в процессе постнатального онтогенеза наблюдается в сыворотке крови, а накопление СЖК и НЛ – и в сыворотке, и в диафрагме, тогда как в скелетных мышцах задних конечностей выражено в меньшей степени. Учитывая тот факт, что в процессе постнатального развития наблюдается аккумуляция СЖК и НЛ в СМ (одной из основных мишеней действия инсулина), можно предположить, что организм на стадии позднего постнатального онтогенеза находится в зоне высокого риска возникновения нарушений в звеньях сигналинга инсулина, что может привести к развитию ИР и СД2Т.

Список литературы

- Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 322с. /Keyts M. Tehhnika lipidologii. – М.: Mir, 1975. – 322s./
- Монастирський В.А. Тромбін-плазмінова система – одна з основних регуляторних систем організму. – Л.: Ліга-Прес, 2007. – 228с. /Monastyrs'kyi V.A. Trombin-plazminova systema – odna z osnovnykh regulatorynykh system organizmu. – L.: Liga-Pres, 2007. – 228s./
- Фролькис В.В. Долголетие: действительное и возможное. – К.: Наукова думка, 1989. – 248с. /Frol'kis V.V. Dolgoletiyе: deystvitel'noye i vozmozhnoye. – K.: Naukova dumka, 1989. – 248s./
- Banno Y. Regulation and possible role of mammalian phospholipase D in cellular functions // J. Biochem. – 2002. – Vol.131. – P. 301–306.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – Vol.37, №8. – P. 911–917.
- Boden G., Lebed B., Schatz M. et al. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects // Diabetes. – 2001. – Vol.50. – P. 1612–1617.

- Clore J.N., Li J., Gill R. et al. Skeletal muscle phosphatidylcholine fatty acids and insulin sensitivity in normal humans // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 1998. – Vol.275. – P. E665–E670.
- Coll T., Rodriguez-Calvo R., Palomer X., Vazquez-Carrera M. Inflammation and fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle cells // *Med. Hypotheses Res.* – 2006. – Vol.3. – P. 739–750.
- Corcoran M.P., Lamon-Fava S., Fielding A. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2007. – Vol.85. – P. 662–677.
- Cortright R.N., Muoio D.M., Dohm G.L. Skeletal muscle lipid metabolism: a frontier for new insights into fuel homeostasis // *Nutritional Biochemistry.* – 1997. – Vol.8. – P. 228–245.
- deFronzo R.A., Jacot E., Jequier E. et al. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization // *Diabetes.* – 1981. – Vol.30, № 12. – P. 1000–1007.
- Ergen N., Kurdak H., Erdogan S. et al. The effects of aerobic exercise on skeletal muscle metabolism, morphology and in situ endurance in diabetic rats // *Journal of sports, science and medicine.* – 2005. – Vol.4. – P. 472–481.
- Gomez-Cambronero J. New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer // *The scientific world journal.* – 2010. – Vol.10. – P. 1356–1369.
- Hulver M.W., Berggren J.R., Cortright R.N. et al. Skeletal muscle lipid metabolism with obesity // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* – 2003. – Vol.284. – P. 741–747.
- Itani S.I., Ruderman N.B., Schmieder F., Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C and IKB-alpha // *Diabetes.* – 2002. – Vol.51. – P. 2005–2011.
- Kelley D.E., Goodpaster B.H., Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance // *Annu. Rev. Nutr.* – 2002. – Vol.22. – P. 325–346.
- Kelley D.E., Williams K.V., Price J.C. et al. Plasma fatty acids, adiposity, and variance of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus // *The journal of clinical endocrinology and metabolism.* – 2001. – Vol.86, №11. – P. 5412–5419.
- Kim J.K., Fillmore J.J., Chen Y. et al. Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance // *Proc. Natl. Acad. USA.* – 2001. – Vol.98. – P. 7522–7527.
- Lahoute C., Sotiropoulos A., Favier M. et al. Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor // *PLoS ONE.* – 2008. – Vol.3, №12. – P. 1–13.
- Lin Y., Itani S.I., Kurowski T.G. et al. Inhibition of insulin signaling and glycogen synthesis by phorbol dibutyrate in rat skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – Vol.281. – P. 8–15.
- 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.
- Mansfield P.J., Carey S.S., Hinkovska-Galcheva V. Ceramide inhibition of phospholipase D and its relationship to RhoA and ARF1 translocation in GTPγS-stimulated polymorphonuclear leucocytes // *Blood.* – 2004. – Vol.103, №6. – P. 2363–2368.
- March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // *J. Lipid Res.* – 1966. – Vol.7, №4. – P. 574–580.
- Montell E., Turini M., Marotta M. et al. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – Vol.280. – P. 229–237.
- Navarro A., Lopez-Cepero J.M., Sanchez del Pino M.J. Skeletal muscle and aging // *Frontiers in Bioscience.* – 2001. – Vol.6. – P. 26–44.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses // *FASEB J.* – 1995. – Vol.9. – P. 484–496.
- Schmitz-Peiffer C., Craig D.L., Biden T.J. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol.274. – P. 24202–24210.
- Shulman G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance // *J. Clin. Invest.* – 2000. – Vol.106. – P. 171–176.
- Toth M.J., Tchernof A. Lipid metabolism in the elderly // *Eur. J. Clin. Nutr.* – 2000. – Vol.54, №3. – P. 121–125.
- Turinsky J., O'Sullivan D.M., Bayly B.P. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin resistant tissues of the rat in vivo // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol.265, №28. – P. 16880–16885.
- Unger R.H. Lipotoxic diseases // *Annu. Rev. Med.* – 2002. – Vol.53. – P. 319–336.

Venable M.E., Blobe G.C., Obeid L.M. Identification of a defect in the phospholipase D/diacylglycerol pathway in cellular senescence // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol.269. – P. 26040–26044.

Williams G.N., Higgins M.J., Lewek M.D. Aging skeletal muscle: physiologic changes and the effects of training // Phys. Ther. – 2002. – Vol.82. – P. 62–68.

Yen C.-L. E., Mar M.-H., Zeisel S.H. Choline deficiency-induced apoptosis I PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of a caspase // FASEB J. – 1999. – Vol. 13. – P. 135–142.

Yu C., Chen Y., Cline G.W. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol-3-kinase activity in muscle // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol.277. – P. 50230–50236.

Zendzian-Piotrowska M., Gorska M., Chocian G., Gorski J. Skeletal muscle phospholipid metabolism in streptozotocin-diabetic rats // Acta Diabetol. – 1999. – Vol.36. – P. 107–111.

Zhong S., Chen C.N., Thompson L.V. Sarcopenia of aging: functional, structural and biochemical alterations // Rev. bras. fisioter. – 2007. – Vol.11, №2. – P. 91–97.

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

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 17.01.2012