

УДК 577.175.44+577.125

ВЛИЯНИЕ α -ТОКОФЕРОЛА НА ИНДУКЦИЮ L-ТИРОКСИНОМ ОБМЕНА ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ СТАРЫХ КРЫС

Лоай Халед Мохаммад Хассунех

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, НИИ биологии
(Харьков, Украина)*

В работе изучали влияние α -токоферола на индукцию L-тироксинам (L-T₄) содержания и обмена липидов в печени и изолированных гепатоцитах старых крыс-самцов линии Вистар. Установлено, что L-T₄ не оказывает существенного влияния на содержание липидов в интактных клетках печени. В то же время, предварительная инкубация гепатоцитов или кусочков печени с α -токоферолом увеличивает чувствительность клеток к действию гормона. Так, содержание церамидов, фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) уменьшается, а уровень сфингомиелина (СФМ) повышается в стимулированных клетках. Отмечено также увеличение уровня вновь синтезированного [¹⁴C]диацилглицерина и снижение – [¹⁴C]ФХ. Полученные данные могут свидетельствовать об активации в данных условиях СФМсинтазы и фосфолипазы Д.

Ключевые слова: *α -токоферол, L-тироксин, печень, гепатоциты, диацилглицерин, церамид, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин.*

Введение

Активация фосфолипаз С/Д и накопление диацилглицерина (ДАГ) в агонистстимулированных клетках является важным этапом сигнальной трансдукции. Установлено, что главными источниками ДАГ являются фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат, фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА). Масса ДАГ может существенно увеличиваться в клетках не только в ходе активации фосфолипаз, но и в результате переноса фосфорилхолина с ФХ на церамид под действием сфингомиелинсинтазы (СФМсинтазы). Обсуждается важная роль этого фермента в передаче информации в клетках и в регуляции базального уровня, как ДАГ, так и церамида в тканях различного типа (Luberto, Hannun, 1998).

Установлено, что при краткосрочном действии L-тироксина (L-T₄) на гепатоциты молодых животных происходит последовательная активация фосфолипаз С и Д, деградация фосфолипидов и накопление ДАГ, что, в свою очередь, приводит к транслокации в мембраны протеинкиназ С и их активации (Kavok et al., 2001). Инкубация изолированных гепатоцитов старых 24-месячных крыс с L-T₄ не сопровождается значительными изменениями уровня фосфолипидов и ДАГ (Kavok, Бабенко, 2001). В то же время, установлено повышение к старости в клетках печени и плазматических мембранах гепатоцитов базального уровня ДАГ (Krasilnikova et al., 2002).

Известно, что одной из важных причин развития состояния резистентности клеток к действию гормонов является хроническое увеличение базального уровня ДАГ и нарушение обмена сфинголипидов (Avignon et al., 1996; Schmitz-Peiffer, 2002). В последние годы установлено, что нормализация обмена сфинголипидов в клетках в старости под действием α -токоферола сопровождается изменением их ответа на различные регуляторные сигналы. α -токоферол, благодаря активации ДАГкиназы, приводит к снижению повышенного базального уровня ДАГ в клетках печени нормальных старых крыс (Куликова, 2005) и в условиях развития диабета (Idris et al., 2001). Ввиду этого целью настоящей работы явилось изучение кратковременного влияния L-T₄ и α -токоферола, и их сочетанного действия на обмен сфинго- и глицеролипидов в печени старых крыс.

Методика

В работе использовали Нерес, трипановый синий ("Serva", Германия), L-тироксин ("Reanal", Венгрия), [¹⁴C]олеиновую кислоту (58 мКи/ммоль) ("Amersham", Англия) и реактивы отечественного производства, квалификации х.ч.

В экспериментах использовали 24-месячных самцов крыс линии Вистар. Перед вскрытием брюшной полости животных наркотизировали диэтиловым эфиром. Гепатоциты выделяли по методу, описанному ранее (Kavok, Бабенко, 2001). Нативность клеток оценивали с помощью трипанового синего. Количество жизнеспособных клеток составляло 90–95 % от общего их числа.

Свежевыделенные гепатоциты ресуспендировали в среде, содержащей 118 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ KН₂РO₄, 1 мМ MgSO₄, 2 мМ СаCl₂, 0,2% NaHCO₃, 0,1% БСА, 61 мг/л пенициллин, 100 мг/л стрептомицин (среда А) и 2 мКи/мл [¹⁴C] олеиновой кислоты, рН 7,5 и инкубировали при 37°С в

течение 90 мин. Концентрация клеток в данном случае составляла 10^7 кл на 1 мл. По окончании инкубации гепатоциты дважды отмывали избытком этого же буфера, охлажденным до 4°C . Впоследствии гепатоциты разводили до концентрации 10^6 кл на 1 мл в среде А. Меченые [^{14}C] олеиновой кислотой клетки или кусочки печени прединкубировали в присутствии α -токоферолу или кукурузного масла в течение 90 мин при 37°C . В отдельных случаях эти клетки подвергали дальнейшей инкубации в присутствии 10 нМ L- T_4 или 100 нМ NaOH в течение 0,5 мин при 37°C . Реакцию останавливали добавлением охлажденной до 4°C смеси хлороформа с метанолом (1:2, об/об).

Экстракцию липидов осуществляли по методу Блайя и Дайера (Bligh, Dyer, 1959). Разделение липидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле в системах растворителей: гексан:диэтиловый эфир:АсОН (73:25:2, об/об) для диацилглицеринов; диэтиловый эфир (1 система) и CHCl_3 : CH_3OH : H_2O (40:10:1, об/об) (2 система) – для церамида и фосфолипидов (Babenko, 2005). Липиды проявляли в парах иода и идентифицировали путем сравнения со стандартами. Количественное определение липидов в хроматографических фракциях проводили по методу Марча и Венштейна (March, Weinstein, 1966). Радиоактивность проб, содержащих меченые [^{14}C]липиды, определяли в сцинтилляторе ЖС-8 с помощью счетчика радиоактивности БЕТА.

Результаты и обсуждение

Установлено, что кратковременная инкубация кусочков печени 24-месячных крыс с L- T_4 не приводит к значительным изменениям уровня церамидов, СФМ, ФХ и ФЭА (рис.). В то же время, предварительная инкубация клеток печени с α -токоферолом увеличивает их чувствительность к кратковременному действию гормона. Так, содержание церамидов, ФХ и ФЭА уменьшается, а уровень СФМ увеличивается под действием гормона. Отношение между ФХ и СФМ (ФХ/СФМ) в клетках печени, прединкубированных с α -токоферолом и L- T_4 , почти в 2 раза выше, чем в контроле, в то время как отношение церамид/СФМ снижается в гормон-стимулированных клетках (табл.). Соотношение между ФХ и ФЭА (ФХ/ФЭА), однако, мало изменяется в данных условиях, что свидетельствует о специфичности действия α -токоферолу и L- T_4 на клетки печени старых животных. Инкубация меченых [^{14}C]олеиновой кислотой гепатоцитов (контрольные клетки) в присутствии L- T_4 не влияло на содержание [^{14}C]ДАГ и [^{14}C]ФХ, и составляло 85 ± 10 и 80 ± 12 % от контроля, соответственно. Однако, прединкубация клеток с α -токоферолом оказывала существенное влияние на метаболизм [^{14}C]-липидов в агонистстимулированных клетках. L- T_4 приводил к резкому увеличению уровня [^{14}C]ДАГ при одновременном снижении содержания [^{14}C]ФХ в клетках, прединкубированных с α -токоферолом. Уровень [^{14}C]ДАГ и [^{14}C]ФХ в стимулированных клетках составлял 190 ± 18 и 58 ± 6 % ($P < 0,05$) от контроля, соответственно. Данные о снижении уровня церамида (рис.) и ФХ/СФМ (табл.) на фоне увеличения содержания ДАГ при сочетанном действии L- T_4 и α -токоферолу на клетки старых животных свидетельствует об активации процесса синтеза СФМ при участии СФМсинтазы. Активация данного фермента в стимулированных клетках приводит к одновременному изменению уровня таких важных для клетки сигнальных липидов, как церамид и ДАГ.

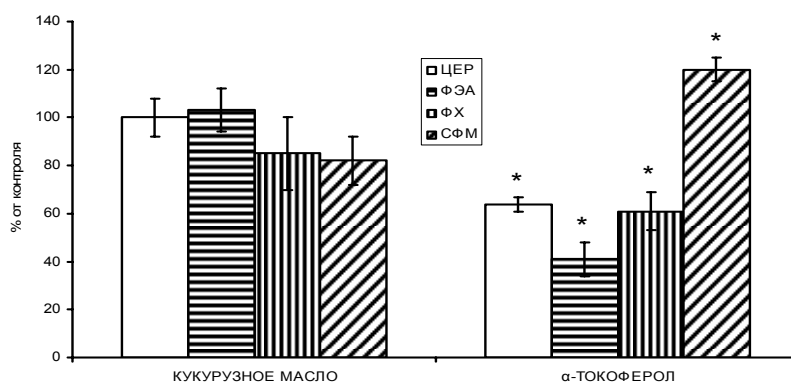


Рис. Влияние α -токоферолу на стимуляцию L- T_4 обмена сфинго- и глицеролипидов в печени 24-месячных крыс

* P контроль - L- T_4 $< 0,05$.

Учитывая то, что церамид является ингибитором фосфолипазы Д (Venabe et al., 1994), можно полагать, что кратковременное снижение содержания этого липида приводит к активации фермента в стимулированных L- T_4 клетках и накоплению биологически активных метаболитов: фосфатидной кислоты (ФК) и ДАГ (Kavok et al., 2001). Источником ФК и ДАГ в старых клетках, подвергнутых

сочетанному действию L-T₄ и α-токоферола, может являться также ФЭА. В пользу данного предположения свидетельствуют данные настоящей работы (табл.) и полученные ранее данные о существенном снижении под действием L-T₄ уровня [¹⁴C]ФЭА на фоне увеличения содержания [¹⁴C]ДАГ в печени и изолированных гепатоцитах половозрелых 3-месячных крыс при отсутствии данного эффекта в клетках интактных старых животных (Кавок, Бабенко, 2001).

Таблица.

Влияние сочетанного действия α-токоферола и L-T₄ на изменение соотношений между отдельными липидами в печени 24-месячных крыс (нмоль/нмоль)

Липиды	Условия эксперимента	Кукурузное масло (контроль)	α-токоферол (опыт)
ФХ/СФМ	NaOH	17,3 ± 3,06	10,7 ± 1,02
ФХ/СФМ	L-T ₄	15,3 ± 2,16	6,40 ± 0,90*
Церамид/СФМ	NaOH	2,96 ± 0,57	2,79 ± 0,58
Церамид/СФМ	L-T ₄	5,14 ± 0,93	1,55 ± 0,50*
ФХ/ФЭА	NaOH	1,93 ± 0,05	1,85 ± 0,17
ФХ/ФЭА	L-T ₄	1,48 ± 0,44	2,29 ± 0,22

* Р контроль – опыт <0,05

Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о реконструкции под действием α-токоферола ДАГ-ответа на действие гормона клеток печени старых животных за счет СФМ-синтазной реакции и, по-видимому, за счет активации ФЭА-специфичной фосфолипазы D. α-токоферол является важным алиментарным фактором регуляции содержания и обмена сигнальных липидов в клетках печени старых животных.

Список литературы

- Кавок Н.С., Бабенко Н.А. Возрастные особенности метаболизма глицеролипидов в печени крыс при кратковременном влиянии тироксина // Український біохімічний журнал. – 2001. – Т.73, №5. – С. 80–84.
- Куликова В.С. Влияние L-тироксина и витамина Е на содержание сигнальных липидов в изолированных гепатоцитах 24-х месячных крыс // Буковинський медичний вісник. – 2005. – Т.9, №2. – С. 141–143.
- Avignon A., Yamada K., Zhou X. et al. Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type ii diabetic Goto-Kakizaki (GK), obese/aged, and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis // Diabetes. – 1996. – Vol.45. – P. 1396–1404.
- Babenko N.A. Long- and short-term effects of thyroxine on sphingolipid metabolism in rat liver // Medical Science Monitor. – 2005. – Vol.11, №5. – P. BR131– BR138.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – Vol.37. – P. 911–917.
- Idris I., Gray S., Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes // Diabetologia. – 2001. – Vol.44. – P. 659–673.
- Kavok N.S., Krasilnikova O.A., Babenko N.A. Thyroxine signal transduction in liver cells involves phospholipase C and phospholipase D activation. Genomic independent action of thyroid hormone // BMC Cell Biology. – 2001. – Vol.2/5. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/2/5>.
- 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. – Vol. 2/12. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6793/2/12>.
- Luberto C., Hannun Y.A. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol.273. – P. 14550–14559.
- March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // J. Lipid Res. – 1966. – Vol.7. – P. 574–580.
- Schmitz-Peiffer C. Protein kinase C and lipid-induced insulin resistance in skeletal muscle // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2002. – Vol.967. – P. 147–157.
- Venabe M. E., Globe 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.

**ВПЛИВ α -ТОКОФЕРОЛУ НА ІНДУКЦІЮ L-ТИРОКСИНОМ ОБМІНУ ЛІПІДІВ
В ПЕЧІНЦІ СТАРИХ ЩУРІВ**
Лоай Халед Мохаммад Хассунех

У роботі вивчали вплив α -токоферолу на індукцію L-тироксином ($L-T_4$) обміну ліпідів в печінці 24-місячних щурів лінії Вістар. Встановлено, що $L-T_4$ не впливає на вміст ліпідів у нормальних клітинах печінки. Попередня інкубація гепатоцитів або шматочків печінки з α -токоферолом збільшує чутливість клітин до дії гормону. Вміст керамідів, фосфатидилхоліну (ФХ) та фосфатидилетаноламіну падає, а рівень сфінгомієліну (СФМ) збільшується у стимульованих клітинах. Відмічено зростання синтезу ФХ та падіння – діацилгліцерину. Отриманні результати можуть свідчити про активацію в даних умовах СФМсинтази та фосфоліпази D.

Ключові слова: *α -токоферол, L-тироксин, печінка, гепатоцити, діацилгліцерин, кераміди, фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, сфінгомієлін.*

**EFFECT OF α -TOCOPHEROL ON THYROXINE-INDUCED LIPID METABOLISM IN LIVER OF
AGED ANIMALS**
Loay Khaled Mohammad Hassouneh

Treatment of old rats by α -tocopherol leads to the prominent decrease of the basal level of diacylglycerol (DAG) in the liver cells and restores the DAG response of hepatocyte to short-term action of thyroid hormone. The effect of $L-T_4$ on DAG and sphingomyelin (SM) accumulation was associated with drop of ceramide, phosphatidylholine (PC) and phosphatidylethanolamine levels in the α -tocopherol pretreated cells. Hormone induces the transfer of phosphocholine from PC to ceramide. Data presented in this communication provide evidence that the age-associated defect in the generation of second messenger (DAG) during hepatocyte stimulation by hormone could be reconstructed by α -tocopherol via activation of SM synthase and phospholipase D.

Key words: *α -tocopherol, L-thyroxine, liver, hepatocytes, ceramide, phosphatidylholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, diacylglycerol.*

Представлено Л.А.Бондаренко
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським