

УДК: 577.115:591.139

## ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ФОСФОЛИПИДОВ В ФУНКЦИОНАЛЬНО РАЗЛИЧНЫХ ТКАНЯХ БЕЛЫХ КРЫС В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

Я.А.Семенова

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

Изучали возрастные особенности содержания и обмена фосфолипидов в печени, почках, гиппокампе и коре головного мозга крыс–самцов линии Вистар. Установлено существенное снижение скорости синтеза наиболее ненасыщенного липида фосфатидилэтаноламина и сигнального липида фосфатидилсерина во всех изучаемых тканях 28-месячных крыс. Возрастные изменения липидного метаболизма, возможно, являются причиной некоторых функциональных расстройств в старости.

Ключевые слова: *старение, печень, почки, кора головного мозга, гиппокамп, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин.*

### Введение

Являясь основными структурными компонентами биологических мембран животных клеток, фосфолипиды имеют большое значение для процессов сигнальной трансдукции. Фосфатидилсерин (ФС) играет важную роль в процессе передачи информации в синапсах, участвуя в высвобождении трансмиттеров (Solfrizzi et al., 2005; Boschero et al., 2000), выступает модулятором активности протеинкиназы С (Bell, Burns, 1991). Зависимая от активации каспаз транслокация ФС в наружный слой мембраны выполняет сигнальную функцию, регулируя действие фагоцитов на начальных стадиях апоптоза (Fadok et al., 1998; Проскуряков и др., 2005). Экспозиция ФС на поверхности активированных тромбоцитов инициирует процессы свертывания крови (Schroit, Zvaal, 1991). Фосфатидилхолин (ФХ) – основной структурный компонент мембран животных клеток – предшественник ряда важных липидных мессенджеров: ненасыщенных жирных кислот, диацилглицеринов, фосфатидной кислоты, лизофосфатидилхолина (Tronchere et al., 1994; Vance, Vance, 2004). ФХ имеет большое значение для образования желчи (Zhaoyu et al., 2005), служит субстратом для синтеза ФС в животных клетках (Vance, 2003). Фосфатидилэтаноламин (ФЭА) – один из наиболее ненасыщенных липидов, входящих в состав клеточной мембраны, содержит много ненасыщенных жирных кислот, следовательно, является источником их активных метаболитов, участвует в сигнальной трансдукции как субстрат фосфолипазы D (Waksman et al., 1997), является предшественником этаноламинового компонента глюкозилфосфатидилинозитоловых якорей, которые связываются с белками на поверхности клеточной мембраны и выполняют сигнальную функцию (Menon, Stevens, 1992).

С возрастом метаболизм липидов нарушается (Guisto et al., 2002; Bourre, 2004). Эти нарушения могут приводить к развитию целого ряда патологических процессов у человека и животных. Так, нарушения соотношения ФХ/ФЭА в мембранах клеток печени считают одной из причин развития стеатоза (Li et al., 2006). Снижение с возрастом в мозге крыс доли полиненасыщенных жирных кислот в составе мембранных фосфолипидов, особенно ФЭА и ФС – является причиной возникновения различных нейрогенеративных заболеваний, нарушения памяти и когнитивных функций (Bourre, 2004; Carrie et al., 2000). Вопрос об особенностях содержания и обмена липидов в условиях нормального старения является очень актуальным и требует более детального изучения.

Являясь основным местом образования липопротеидов и липидов, печень играет ключевую роль в липидном метаболизме и представляет значительный интерес для исследований возрастных особенностей их содержания и обмена. Вырабатываемые почками простагландины – метаболиты полиненасыщенной арахидоновой кислоты – действуют как сосудорасширяющий и провоспалительный фактор, и возрастные нарушения в обмене липидов могут приводить к гипертонии и воспалительным процессам в почечных клубочках (Чайченко и др., 2003; Fernandes et al., 1998). Высоким уровнем содержания и многообразием липидов характеризуются мембраны нервных клеток. Ткани головного мозга – особенно чувствительны к липидным перестройкам, часто наблюдаемым в старости и вызывающим морфологические и функциональные патологии нервной системы в целом (Akbar et al., 2005; Solfrizzi et al., 2005).

Учитывая вышесказанное, целью данной работы является изучение возрастных особенностей содержания и обмена фосфолипидов в печени, почках, гиппокампе и коре головного мозга крыс линии Вистар.

### Методика

Для исследования использовали intactных самцов крыс линии Вистар 3-, 24- и 28-месячного возраста. Экстракцию липидов из гомогенатов печени, почек, гиппокампа и коры головного мозга проводили по методу Блая и Дайера (Bligh, Dyer, 1959). В качестве предшественника синтеза липидов использовали  $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$  (удельная радиоактивность  $1,7 \cdot 10^{12}$  Бк/моль). Разделение липидов по фракциям проводили методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей хлороформ : метанол : уксусная кислота : муравьиная кислота : вода (35:15:6:2:1, по объему). Хроматографические пластины (Sorbfil, Россия) проявляли в парах йода. Пятна ФС проявляли при опрыскивании хроматограмм 3% раствором нингидрина в насыщенном водой бутаноле. Липиды идентифицировали сравнением со стандартами. Содержание липидов определяли по методу Марча и Вейнштейна (March, Weinstein, 1966). Содержание общего белка в гомогенатах тканей определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Радиоактивность меченых липидов измеряли с помощью счетчика радиоактивности БЭТА. Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Расхождения между группами считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Инкубация гомогенатов печени, почек и гиппокампа крыс разного возраста с  $^{14}\text{CH}_3\text{COONa}$  сопровождается включением метки в исследуемые фосфолипиды: ФС, ФХ и ФЭА. Интенсивность синтеза ФС в печени и почках 24- и 28-месячных крыс снижается по сравнению с 3-месячными животными (рис. 1А, В).

В гиппокампе снижение синтеза данного липида отмечается лишь у 28-месячных крыс по сравнению с молодыми животными (рис. 1С). Интенсивность синтеза ФС в этой ткани у 24-месячных животных такая же, как у 3-месячных. Уровень вновь синтезированного ФХ снижается в печени и гиппокампе 28-месячных животных по сравнению с молодыми, активность синтеза этого липида во всех изученных тканях 24-месячных крыс не отличалась от таковой у 3-месячных животных (рис. 1А, С). В почках возрастных изменений в синтезе ФХ нами не было обнаружено (рис. 1В). Результаты нашего исследования показали, что уровень вновь синтезированного ФЭА достоверно снижается в процессе старения в печени и почках опытных животных. В гиппокампе 24-месячных животных активность синтеза этого липида повышается по сравнению с контрольными 3-месячными животными, а затем снижается у крыс 28-месячного возраста (рис. 1С).

Полученные в ходе настоящего исследования данные указывают, что уровень ФХ понижается у старых крыс в печени и гиппокампе, не изменяясь при этом в почках, и увеличивается в коре головного мозга 28-месячных крыс по сравнению с 3-месячными (табл. 1).

Масса ФЭА снижается в печени и мозге очень старых 28-месячных крыс и увеличивается в процессе старения в почках опытных животных (табл. 2).

Опубликованные нами ранее данные (Хассунех и др., 2006) показали снижение массы ФС в гиппокампе старых животных и отсутствие существенных изменений массы данного липида в печени старых животных по сравнению с 3-месячными.

Таким образом, среди изучаемых нами липидов наиболее подвержена изменениям скорость синтеза ФС, резко снижаясь в процессе старения в печени и почках опытных животных. В то же время, синтез ФХ более стабилен, он не изменяется в почках экспериментальных крыс, а понижается в печени и гиппокампе лишь очень старых – 28-месячных животных. Масса всех изучаемых липидов, кроме ФС, снижается в печени очень старых крыс. В коре головного мозга масса ФХ повышается с возрастом, а ФЭА снижается. При этом отмечено понижение содержания ФЭА и ФХ в гиппокампе, а уровень ФС старых крыс в этой ткани снижается.

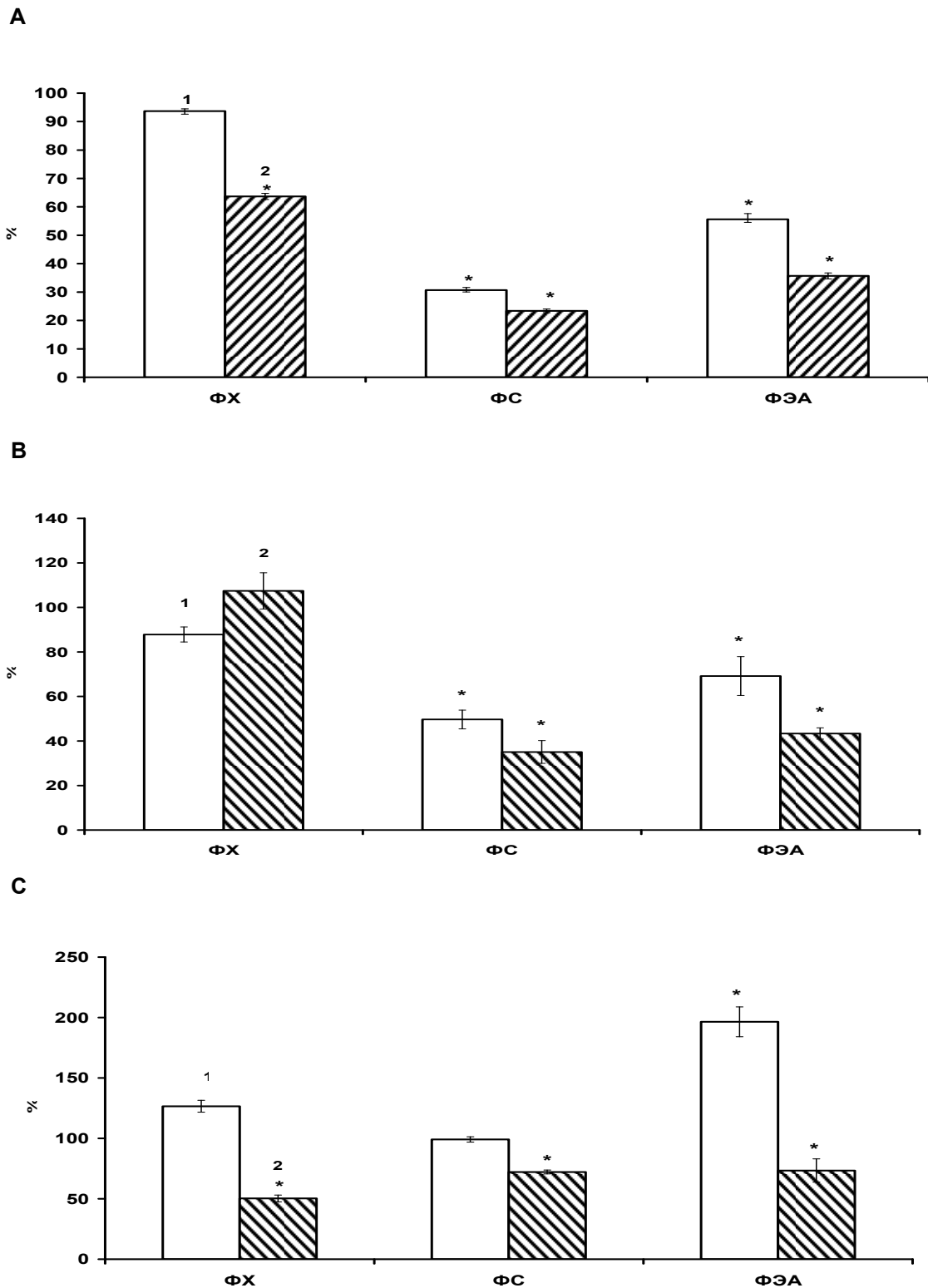


Рис. 1. Уровень вновь синтезированных фосфолипидов в тканях крыс разного возраста (% от 3-месячных крыс); А – печень, В – почки, С – гиппокамп. 1 – 24-месячные, 2 – 28-месячные крысы

\* $p < 0,05$ , достоверно по сравнению с 3-месячными животными.

Таблица 1.

Возрастные особенности содержания ФХ в тканях крыс разного возраста (нмоль/мг белка)

Ткань	Возраст, мес.		
	3	24	28
Печень	97,39±7,28	73,64±8,4*	73,59±1,08*
Почки	39,02±6,4	32,03±3,67	46,08±1,1
Кора	212,88±11,5	-	264,07±6,62*
Гиппокамп	396,65±12,4	-	140,53±4,7*

\* $p < 0,05$ , достоверно по сравнению с 3-месячными животными.

Таблица 2.

Возрастные особенности содержания ФЭА в тканях крыс разного возраста (нмоль/мг белка)

Ткань	Возраст, мес.		
	3	24	28
Печень	50,6±7,6	49,51±4,87	36,60±0,76*
Почки	24,1±3,1	42,26±6,24*	47,64±1,71*
Кора	375,34±7,46	-	343,26±11,15*
Гиппокамп	446,57±36,81	-	285,00±15,62*

\* $p < 0,05$ , достоверно по сравнению с 3-месячными животными.

### Обсуждение

Известно, что ФС образуется в животных клетках путем реакции обмена основаниями, в которой ФХ или ФЭА являются субстратами для синтеза ФС. Метаболизм этих липидов тесно связан. Важным путем синтеза ФЭА является декарбоксилирование ФС. В исследованиях на линиях клеток СНО (Kuge et al., 1999) установлено, что более 80% ФЭА синтезируется путем декарбоксилирования ФС, даже тогда, когда в культуру добавляли достаточное количество этаноламина для поддержания синтеза ФЭА ЦДФ-этанолaminовым путем. По данным Reo и соавт. (Reo et al., 2002), 30–40 % ФХ в гепатоцитах крыс синтезируется в ходе метилирования ФЭА. Данные настоящего исследования показали, что уровень вновь синтезированного ФЭА понижается у 28-месячных крыс во всех исследуемых тканях, а интенсивность синтеза ФХ понижается в печени и гиппокампе 28-месячных крыс по сравнению с 3-месячными. Поэтому можно предположить, что снижение уровня вновь синтезированных ФХ и ФЭА и является причиной снижения синтеза ФС в данных тканях.

Известно, что ФС имеет большое значение для нормального функционирования нейронов головного мозга. В частности, известно его участие в высвобождении нейротрансмиттеров в синапсах (Solfrizzi et al., 2005). С возрастом отмечают снижение количества синапсов в гиппокампе и коре головного мозга, с чем связывают нарушение ответной реакции на сигналы внешней среды, нервные и гормональные стимулы, ослабление пространственной памяти (Хавинсон и др., 2003). В результате проведенных нами исследований было показано, что в гиппокампе уровень вновь синтезированного ФС мало изменяется у 24-месячных крыс и резко снижается у 28-месячных по сравнению с 3-месячными. Известно, что интенсивность синтеза данного липида в коре головного мозга повышается в условиях гипоксии (Mozzi et al., 1997), под воздействием таких токсических факторов, как амилоид бета 1-40 (Koudinova et al., 2000), при апоптической гибели клеток (Vance, Vance, 2004). Возможно, адаптивные возможности очень старых животных истощаются, что приводит к нарушению и повышению чувствительности тканей к действию подобных факторов.

Снижение интенсивности синтеза ФЭА указывает на возможное ингибирование с возрастом синтеза ФЭА путем декарбоксилирования ФС. Так, показано, что активность ФС-декарбоксилазы снижается в коре головного мозга старых крыс по сравнению с половозрелыми животными (Salvador et al., 2002). Не исключено, что подобное явление может наблюдаться и в других тканях крыс.

Интересно, что в мозге 24-месячных животных синтез ФЭА повышается по сравнению с 3-месячными, а затем резко снижается у 28-месячных. По некоторым данным, в стареющем мозге крыс

повышается синтез ФХ путем метилирования ФЭА (Guisto et al., 2002). Однако наши результаты не показали достоверных изменений в интенсивности синтеза ФХ у 24-месячных животных по сравнению с 3-месячными ни в одной исследуемой ткани. Недавними исследованиями на печени линии мышей с дефицитом по ферменту ФЭА-N-метилтрансферазы было показано, что отношение ФХ/ФЭА играет ключевую роль в поддержании целостности клеточной мембраны. Снижение данного отношения является фактором риска при некоторых заболеваниях печени (Li et al., 2006). Возможно, снижение интенсивности синтеза обоих липидов в печени 28-месячных крыс направлено на поддержание постоянства вышеуказанного отношения. Так, полученные в ходе настоящего эксперимента данные свидетельствуют об отсутствии снижения соотношения ФХ/ФЭА с возрастом (1,01–1,71–1,95 для 3-, 24-, 28-месячных крыс, соответственно).

Наши исследования показали снижение массы ФЭА в мозге 28-месячных крыс по сравнению с 3-месячными животными. ФЭА – наиболее ненасыщенный фосфолипид мозга, в котором аккумулируются ненасыщенные жирные кислоты, в частности докозагексаеновая, недостаток которой может быть причиной таких нейрогенеративных заболеваний как генерализированное пероксисомальное расстройство и болезнь Альцгеймера (Akbar et al., 2005). Возможно, недостаток ФЭА и есть причина развития данных патологий именно в старческом возрасте.

Таким образом, в результате настоящих исследований показано существование возрастных особенностей синтеза фосфолипидов и тканеспецифичные изменения липидного состава в процессе старения. Достоверное снижение интенсивности синтеза ФС во всех изучаемых тканях 28-месячных крыс, возможно, имеет адаптивное физиологическое значение. Снижение интенсивности синтеза ненасыщенных липидов в мозге в процессе старения может быть одним из факторов, влияющих на развитие нейродегенеративных деменций, частота возникновения которых резко повышается в старости.

#### Список литературы

- Проскуряков С.Я., Габай В.Л., Конопляников А.Г. и др. Иммунология апоптоза и некроза // Биохимия. – 2005. – Т.70, №12. – С. 1953–1605.
- Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Ингель И.Э. и др. Возрастная инволюция органов и тканей // Успехи физиол. наук. – 2003. – Т.34, №1. – С. 78–91.
- Хассунех Л., Семенова Я.О., Красильникова О.А. та ін. Вікові особливості вмісту сигнальних ліпідів у печінці та мозку шурів // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т.52, №6. – С. 79–84.
- Чайченко Г.М., Цибенко В.О., Сокур В.Д. Фізіологія людини та тварин: Підручник. – К.: Вища шк., 2003. – 463с.
- Akbar M., Calderon F., Wen Z. et al. Docosahexaenoic acid: A positive modulator of Akt signaling in neuronal survival // PNAS. – 2005. – Vol.102, №31. – P. 10858–10863.
- Bell R.M., Burns D.J. Lipids activation of protein kinase C // J. Biol. Chem. – 1991. – Vol.266. – P. 4661–4664.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – Vol.37, №8. – P. 911–917.
- Boschero M.G., Roque M.E., Salvador G.A. et al. Alternative pathways for phospholipids synthesis in different brain areas during aging // Exp. Geront. – 2000. – Vol.35, №5. – P. 653–658.
- Bourre J.M. Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during aging // J. Nutr. Health Aging. – 2004. – Vol.8, №3. – P. 163–174.
- Carrie I., Clement M., Javel D. et al. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alteration induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice // J. Lipid Res. – 2000. – Vol.41. – P. 473–480.
- Fadok V.A., Bratton D.L., Frasch S.C. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes // Cell Death Differ. – 1998. – Vol.5, №7. – P. 551–562.
- Fernandes G., Troyer D., Jolly C. The effects of dietary lipids on gene expression and apoptosis // Proc. Nutr. Soc. – 1998. – Vol.57. – P. 543–550.
- 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. – Vol.27, №11. – P. 1513–1523.
- 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. – Vol.25. – P. 653–660.
- Kuge O., Saito K., Nishijima M. Control of phosphatidylserine synthase II activity in Chinese hamster ovary cells // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol.274, №34. – P. 23844–23849.
- Li Z., Agellon L.B., Allen T.M. et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis // Cell Metab. – 2006. – Vol.3, №5. – P. 321–331.

- Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193. – P. 365–375.
- March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // The Journal of Lipid Research. – 1966. – Vol.7, №4. – P. 574–580.
- Menon A.K., Stevens V.L. Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol.267, №22. – P. 15377–15280.
- Mozzi R., Andreoli V., Buratta S. et al. Different mechanism regulate phosphatidylserine synthesis in rat cerebral cortex // Mol. Cell Biochem. – 1997. – Vol.168, №12. – P. 41–49.
- Reo N.V., Adinezhadeh M., Foy B.D. Kinetic analyses of liver phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis using  $(13) C$  NMR spectroscopy // Biochem. Biophys. Acta. – 2002. – Vol.1580, № 2–3. – P. 171–188.
- Salvador G.A., Lopez F.M., Giusto N.M. Age-related changes in central nervous system phosphatidylserine decarboxylase activity // J. Neurosci. Res. – 2002. – Vol.70, №3. – P. 283–289.
- Schroit A.J., Zwaal R.F. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes // Biochim. Biophys. Acta. – 1991. – Vol.1071, №3. – P. 313–329.
- Solfrizzi V., D'Intronto A., Colacicco A.M. et al. Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia // Exp. Geront. – 2005. – Vol.40. – P. 257–270.
- Tronchere H., Record M., Terce F. et al. Phosphatidylcholine cycle and regulation of phosphatidylcholine biosynthesis by enzyme translocation // Biochimica et Biophysica Acta. – 1994. – Vol.1212. – P. 137–151.
- Vance J.E., Vance D.E. Phospholipid biosynthesis in mammalian cells // Biochem. Cell Biol. – 2004. – Vol.82. – P. 113–128.
- Vance J.E. Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism // Prog. Nucleic Acid Res. Biol. – 2003. – Vol.75, №11. – P.111.
- Waksman M., Tang X., Eli Y. et al. Identification of a novel  $Ca^{2+}$ -dependent, phosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D in yeast bearing a disruption in PLD1 // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol.272, №3. – P. 36–39.
- Zhaoyu L., Agellon L.B., Vance D.E. Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure // JBC Papers in Press. – 2005. – P. 1–10.

**ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ ФОСФОЛІПІДІВ У ФУНКЦІОНАЛЬНО РІЗНИХ ТКАНИНАХ БІЛИХ  
ЩУРІВ В ПРОЦЕСІ СТАРІННЯ  
Я.О.Семенова**

Вивчали вікові особливості вмісту та обміну фосфоліпідів в печінці, нирках, гіпокампі та корі головного мозку щурів–самців лінії Вістар. Встановлено суттєве зниження швидкості синтезу основного найбільш ненасиченого ліпиду фосфатидилетаноламіну та сигнального ліпиду фосфатидилсерину в усіх досліджуваних тканинах 28-місячних щурів. Вікові зміни ліпідного метаболізму, можливо, є причиною деяких функціональних розладів у старості.

Ключові слова: *старіння, печінка, нирки, кора головного мозку, гіпокамп, фосфатидилсерин, фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін.*

**AGE PECULIARITIES OF PHOSPHOLIPID LEVEL IN RAT TISSUES  
Ya.A.Semenova**

The age peculiarities of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine content in liver, kidney, hippocampus and brain cortex have been investigated. It has been determined that phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine synthesis in observed tissues drops in old age. It has been supposed that decrease of synthesis of unsaturated lipids in old brain is the possible factor of age-associated neurodegenerative dementia.

Key words: *aging, liver, kidney, brain cortex, hippocampus, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine.*

Представлено Н.О.Мітряєвою  
Рекомендовано до друку П.А.Каліманом