

СОДЕРЖАНИЕ КОМПОНЕНТОВ СФИНГМИЕЛИНОВОГО ЦИКЛА В ПЕЧЕНИ КРЫС В ДИНАМИКЕ НЕПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ГОЛОДАНИЯ**Дмитрий Иванович КУЗЬМЕНКО, Павел Геннадьевич БУРОВ, Владимир Юрьевич СЕРЕБРОВ***ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, кафедра биохимии и молекулярной биологии 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2*

Изучали характер изменения содержания компонентов сфингомиелинового цикла в печени крыс в динамике голодания. Показано, что содержание сфингомиелина (СМ) в печени достоверно уменьшалось при 48-часовом и увеличивалось при 72-часовом голодании по сравнению с контролем. Содержание церамида возрастало при голодании в течение 48 часов и возвращалось к уровню контроля при 72-часовом голодании. Содержание сфингозина не претерпевало существенных изменений. В соответствии с реципрокным характером сдвигов содержания СМ и церамида, изменялось отношение церамид/СМ. При 48-часовом голодании отношение достоверно увеличивалось по сравнению с контролем, при 72-часовом голодании — возвращалось к исходному значению. Полученные результаты могут указывать на фазное изменение активности ключевого фермента цикла — сфингомиелиназы и, как следствие, на активацию церамид-опосредованного апоптоза в печени при 48-часовом голодании. Обсуждается роль нескольких факторов, которые в рамках исследуемых сроков голодания могут оказывать определяющее влияние на активность сфингомиелиназы, а также значение активации апоптоза в механизме адаптивной реакции клеточного сообщества печени (оптимизации клеточного состава печени) при непродолжительном голодании.

Ключевые слова: сфингомиелиновый цикл, печень крыс, непродолжительное голодание.

Компоненты сфингомиелинового цикла выполняют функции вторичных посредников, играющих ключевые роли в реализации важнейших событий в жизнедеятельности клетки, включая участие как в про-, так и антиапоптотической сигнализации [1]. Апоптоз можно рассматривать как один из механизмов оптимизации клеточного состава функциональных систем организма, которые доминируют в его адаптации к изменяющимся условиям существования. Явления программированной гибели клеток участвуют в формировании системного структурного следа долговременной (фенотипической) адаптации на органном уровне, позволяющего достигнуть предельной уровня работоспособности в новых условиях [2, 3]. Есть данные, свидетельствующие об участии компонентов сфингомиелинового цикла в адаптации энергетического обмена скелетных мышц [4]. Этот аспект в отношении печени, играющей ключевую роль в обеспечении энергетического гомеостаза на уровне целостного организма, как в норме, так и в условиях его функционального напряжения, остается не исследованным. Настоящая работа предпринята с целью изучения характера сдвигов содержания компонентов сфингомиелинового цикла в печени крыс в динамике 72-часового голодания. Для крыс голодание такой продолжительности полностью обратимо: спустя

12-15 часов после возобновления кормления все метаболические сдвиги возвращаются к норме [5], что позволяет рассматривать ответную реакцию печени в пределах 72-часового голодания как адаптивную.

Материалы и методы

Исследования проведены на самцах крыс Вистар с массой 140-160 г, которые были получены из центрального вивария ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава. Содержание, питание, уход за крысами и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. №755). Методом случайной выборки животные были распределены на две группы: контроль (интактные крысы) и опыт. Состояние функционального напряжения организма у животных группы «опыт» воспроизводили, подвергая их голоданию в течение 72 часов без ограничения доступа к питьевой воде. Печень перед извлечением из брюшной полости перфузировали *in situ* ледяным 0,9% раствором NaCl через *v. portae*. Липидный экстракт из печени получали методом Фолча. Содержание компонентов сфингомиелинового цикла определяли хроматографически в тонком слое силикагеля на

Кузьменко Д.И. — д.м.н., профессор кафедры, e-mail: dik51@mail.ru
Буров П.Г. — очный аспирант кафедры, e-mail: torchhead@pochta.ru
Серебров В.Ю. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой

Таблица 1

Содержание компонентов сфингомиелинового цикла в печени крысы в динамике голодания ($X \pm m$)

Показатели	Контроль, (n=10)	Опыт	
		Голодание 48 часов (n = 10)	Голодание 72 часа (n = 10)
СМ	$40,900 \pm 1,337$ $4,374 \pm 0,392$	$36,500 \pm 1,529^*$ $4,802 \pm 0,468$	$46,222 \pm 4,358$ $7,011 \pm 1,320^*$
Сфингозин	$25,700 \pm 1,739$ —	$28,000 \pm 1,687$ —	$27,333 \pm 2,438$ —
Церамид	$33,400 \pm 1,507$ $0,617 \pm 0,097$	$35,500 \pm 0,860$ $0,734 \pm 0,092^*$	$26,778 \pm 5,479$ $0,532 \pm 0,098$
Отношение церамид / СМ	$0,828 \pm 0,048$ $0,128 \pm 0,007$	$1,034 \pm 0,070^*$ $0,150 \pm 0,007^*$	$0,710 \pm 0,184$ $0,108 \pm 0,029$

Примечания: результаты представлены в двух форматах: числитель — процентная доля площадей пиков индивидуальных сфинголипидов на денситограмме; знаменатель — мг соответствующих сфинголипидов на 1 г массы печени. Здесь и в Таблице 2 в скобках указано число животных; достоверные отличия от контроля: * - $P < 0,05$, $P < 0,01$.

пластинках «Silufol UV 254» (Чехия) в системе растворителей толуол: метанола (7 : 3). Окрашивание фракций производили 10 % раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле, количественное определение вели с помощью программы Chrom 3.1 for Windows. Об активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени животных судили по содержанию продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБКАП), активность каталазы в печени оценивали по скорости потребления в среде инкубации перекиси водорода, которую определяли с помощью реакции с молибденовоокислым аммонием, содержание восстановленного глутатиона — с помощью 5,5'-дителиобис (2-нитробензойной кислоты), концентрацию белка — микробиуретовым методом. Статистическую обработку осуществляли с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. Был также применен линейный корреляционный анализ.

Результаты и обсуждение

Было установлено, что в зависимости от сроков голодания сдвиги содержания компонентов сфингомиелинового цикла в печени экспериментальных животных носили выраженный фазный характер (Табл. 1). Для сфингомиелина (СМ) характерным было снижение содержания при 48-часовом голодании и существенное повышение — при 72-часовом голодании по сравнению с уровнем контроля ($P < 0,05$). Содержание церамида возрастало при голодании в течение 48 часов и возвращалось к уровню контроля при 72-часовом голодании. В хорошем соответствии с реци-

прокным сдвигами содержания СМ и церамида в динамике голодания изменялось отношение церамид/сфингомиелин. Так, при 48-часовом голодании отношение достоверно увеличивалось по сравнению с контролем, в то время как при 72-часовом голодании параметр возвращался к исходному значению. Содержание сфингозина в печени крыс на всем протяжении эксперимента не претерпевало существенных изменений. Коэффициенты корреляции между двумя форматами представления динамики содержания СМ и церамида в печени крыс, а также отношения церамид/СМ в таблице 1 составили 0,813, 0,928 и 0,992 соответственно.

Данные, представленные в таблице 2, свидетельствуют о наибольшей активации свободнорадикального окисления липидов в печени крыс при 72-часовом голодании: усиливалась тенденция к снижению активности каталазы и достоверно уменьшалось содержание восстановленного глутатиона в печени ($p < 0,05$) на фоне высокого содержания ТБКАП ($P < 0,01$). Вычисленный индекс — активность каталазы / концентрация ТБКАП оказался существенно меньше такового в контроле при 48-часовом голодании ($P < 0,01$) и в еще большей степени — при 72-часовом голодании ($P < 0,01$) — в 2,05 и 2,4 раза соответственно. Наши результаты согласуются с данными литературы, указывающими на активацию процессов ПОЛ при голодании [6].

В доступной литературе отсутствуют сведения, касающиеся характера изменения содержания компонентов сфингомиелинового цикла и активности СМазы в печени при голодании.

Таблица 2

Концентрация ТБКАП (нмоль/мг белка), активность каталазы (мккат/мг белка) и содержание восстановленного глутатиона (мкмоль/мг белка) в печени крыс в динамике голодания ($X \pm m$)

Показатели	Контроль	Опыт	
		Голодание 48 часов	Голодание 72 часа
ТБКАП	0,907 \pm 0,090	2,573 \pm 0,581**	2,408 \pm 0,386**
Активность каталазы	31,367 \pm 2,686	37,099 \pm 3,986	27,564 \pm 1,967
Отношение каталаза / ТБКАП	33,469 \pm 3,465	16,356 \pm 2,580**	14,208 \pm 2,089**
Глутатион восстановленный	1,153 \pm 0,142	1,222 \pm 0,199	0,745 \pm 0,162*

Мы полагаем, что одной из определяющих причин изменения содержания метаболитов цикла в печени голодавших крыс является фазное изменение активности нейтральной СМазы, ключевого фермента цикла, гидролизующего СМ до церамида — индуктора апоптоза [7]. Реципрокная направленность сдвигов концентраций СМ и церамида в печени крыс, обусловившая достоверное увеличение отношения церамид/СМ при 48-часовом голодании (Табл. 1), позволяет предполагать, что активация СМазы может происходить на данном сроке голодания.

При интерпретации полученных нами результатов были учтены следующие обстоятельства. Так, состояние функционального напряжения организма, в том числе и голодание, сопровождается повышением концентрации глюкокортикоидов в крови [8]. Эти гормоны влияют на продукцию и содержание в крови фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) [9], который является одним из активаторов нейтральной СМазы, запускающий церамидопосредованный апоптоз [7]. Известно также, что в образование ФНО- α значительный вклад вносит жировая ткань [10]. Продукция цитокина пропорциональна ее массе, которая прогрессивно уменьшается при голодании. Существенную роль в активации СМазы играет окислительный стресс. Хотя механизм этого эффекта полностью не изучен, установлено, что повышение тканевого содержания ФНО- α всегда сопровождается активацией там процессов ПОЛ [11, 12]. Согласно нашим результатам интенсивность процессов ПОЛ нарастала по мере увеличения сроков эксперимента, достигая максимальной выраженности при 72-часовом голодании за счет истощения функциональных возможностей системы антиоксидантной защиты печени. Необходимо также учитывать характерную трансформацию липидного бислоя

клеточных мембран в условиях существенной активации процессов ПОЛ, которая способна изменить доступность субстрата для СМазы, а также возможность прямого влияния продуктов ПОЛ на фермент [11]. В настоящее время не определены четкие количественные критерии, позволяющие иметь градации выраженности окислительного стресса, в том числе ту его степень, которая поддерживает активацию СМазы, что позволило бы сопоставить данные разных авторов. Наконец, важным фактором, способным изменить активность СМазы и баланс компонентов сфингомиелинового цикла в печени, может быть повышение при голодании содержания в сыворотке крови липопротеидов низкой и очень низкой плотности [3], в составе которых у крыс транспортируется основная часть сфингомиелина и церамида соответственно [13].

Результаты наших исследований и высказанные предположения согласуются с данными единственной работы, в которой показано достоверное и обратимое (после возобновления кормления) усиление активности апоптоза в печени крыс при 48-часовом голодании [14]. Природа апоптотического сигнала в цитируемой работе не рассматривалась.

Мы полагаем, что *in vivo* функциональное состояние СМ-азы печени определяется одновременным влиянием нескольких, различных по своей природе, регуляторных факторов, способных оказывать разнонаправленные эффекты. Очевидно и то, что в динамике голодания относительный вклад регулирующих факторов меняется. Эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

Литература

1. Ruvolo P.P. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites // Pharmacol. Res. 2003. 47. 383–392.

2. Москалева Е.Ю., Северин С.Е. Возможные механизмы адаптации клетки к повреждениям, индуцирующим программируемую гибель. Связь с патологией // Патол. физиол. 2006. (2) : 2–16.
3. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск: Наука, 1983. 234.
4. Helge J.W., Dobrzyn A., Saltin B., Gorski J. Exercise and training effects on ceramide metabolism in human skeletal muscle // Exp. Physiol. 2004. 89 (1). 119–127.
5. McGarry J.D. The effect of starvation and refeeding on carbohydrate and lipid metabolism in vivo and in the perfused rat liver. The relationship between fatty acid oxidation and esterification in the regulation of keto-genesis // J. Biol. Chem. 1973. 248. 270–278.
6. Marczuk-Kruniczka D., Hryniewiecki T., Piatek J., Paluszak J. The effect of brief food withdrawal on the level of free radicals and other parameters of oxidative status in the liver // Med. Sci. Monit. 2003. 9. 131–135.
7. Andrieu-Abadie N., Levade T. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis // Biochim. Biophys. Acta. 2002. 1585 (2–3). 126–134.
8. Faggioni R., Moser A., Feingold K.R., Grunfeld C. Reduced leptin levels in starvation increase susceptibility to endotoxic shock // Am. J. Pathology. 2000. 156. 1781–1787.
9. Fantuzzi G., Santo E.D., Sacco S. et al. Role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the regulation of TNF production in mice // J. Immunology. 1995. 155. 3552–3555.
10. Vernon R.G., Denis R.G., Sorensen A. Signals of adiposity // Domestic Animal Endocrinology. 2001. 21. 197–214.
11. Гутнер У.А., Дудник Л.Б., Коробко В.Г., Аlesenко А.В. Действие фактора некроза опухоли α на сфингомиелиновый цикл и перекисное окисление липидов // Журнал неврологии и психиатрии. 2005. (4). 48–54.
12. Alesenko A.V., Shupik M.A., Gutner U.A. et al. The relation between sphingomyelinase activity, lipid peroxide oxidation and NO-releasing in mice liver and brain // FEBS Lett. 2005. 579. 5571–5576.
13. Merrill A.H., Lingrell S., Wang E. et al. Sphingolipids biosynthesis de novo by rat hepatocytes in culture. Ceramide and sphingomyelin are associated with, but not required for, very low density lipoprotein secretion // J. Biol. Chem. 1995. 270. 13834–13841.
14. Kouda K., Nakamura H., Kohno H. et al. Dietary restriction: effects of short-term fasting on protein uptake and cell death/proliferation in the rat liver // Mech. Ageing Dev. 2004. 125. 375–380.

THE MAINTENANCE OF COMPONENTS A SPHINGOMYELIN CYCLE IN THE LIVER OF RATS IN DYNAMICS OF SHORT STARVATION

Dmitry Ivanovich KUZ'MENKO, Pavel Gennadievich BUROV, Vladimir Yurievich SEREBROV

The Siberian state medical university
Department of biochemistry and molecular biology
2, Moskovskiy trakt, Tomsk, 634050

Studied character of change of the maintenance of components a sphingomyelin cycle in a liver of rats in dynamics of starvation. It is shown, that the maintenance of sphingomyelin in a liver authentically decreased at 48-hour and increased at 72 hour starvation in comparison with the control. The maintenance of ceramide increased at starvation within 48 hours and came back to a level of the control over 72-hour starvation. The maintenance of sphingosine did not undergo essential changes. According to reciprocal character of shifts of maintenance sphingomyelin and ceramide the ratio ceramide / sphingomyelin changed. At 48-hour starvation the ratio authentically increased in comparison with the control, over 72-hour starvation - came back to a reference value. The received results can specify phase change of activity of key enzyme of a cycle - sphingomyelinase and, as consequence, on activation ceramide-mediated apoptosis in a liver at 48-hour starvation. The role of several factors which starvations within the limits of investigated terms can render defining influence on activity of sphingomyelinase, and also value of activation of apoptosis in the mechanism of adaptive reaction of cellular community of a liver (optimization of cellular structure of a liver) is discussed at short starvation.

Key words: sphingomyelin cycle, rat liver, short starvation.

Kuz'menko D.I. – e-mail: dik51@mail.ru
Burov P.G. – e-mail: torchhead@pochta.ru
Serebrov V.Yu. – e-mail: serebrov@ssmu.ru