

... БІОХІМІЯ ... BIOCHEMISTRY ...

УДК: 612.35:612.444

Возрастные особенности краткосрочной тиреоидной регуляции липогенеза в клетках печени самцов крыс линии *Wistar* В.В.Гарькавенко

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

Исследовали особенности краткосрочной тиреоидной регуляции метаболизма холестерина и нейтральных липидов в изолированных гепатоцитах молодых (3-месячных) и старых (24-месячных) самцов крыс. Показано, что в течение 60 минут тироксин активирует синтез липидов из $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{COONa}$ и накопление свободных жирных кислот и холестерина в клетках печени 3-месячных крыс, на фоне снижения экскреции холестерина в среду инкубации, в то время как в гепатоцитах 24-месячных крыс краткосрочное воздействие тироксина не вызывает статистически значимых изменений в интенсивности синтеза холестерина и свободных жирных кислот.

Ключевые слова: тироксин, старение, холестерин, жирные кислоты.

Вікові особливості короткострокової тиреоїдної регуляції ліпогенезу в клітинах печінки самців щурів лінії *Wistar* В.В.Гарькавенко

Досліджували особливості короткострокової тиреоїдної регуляції метаболізму холестерину та нейтральних ліпідів в ізольованих гепатоцитах молодих (3-місячних) та старих (24-місячних) самців щурів. Показано, що протягом 60 хвилин тироксин активує синтез ліпідів з $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{COONa}$ і накопичення вільних жирних кислот та холестерину в клітинах печінки 3-місячних щурів, водночас зі зниженням екскреції холестерину в середовище інкубації, у той час як в гепатоцитах 24-місячних щурів короткостроковий вплив тироксину не викликає статистично значущих змін в інтенсивності синтезу холестерину та вільних жирних кислот.

Ключові слова: тироксин, старіння, холестерин, жирні кислоти.

Age features of the short-term thyroid lipogenesis regulation in the liver cells of male *Wistar* rats V.V.Garkavenko

The short-term thyroid metabolic regulation of cholesterol and neutral lipids in hepatocytes isolated from young (3-month-old) and old (24-month-old) male rats was studied. It has been determined that within 60 minutes thyroxine activates the synthesis of lipids from $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{COONa}$ and accumulation of free fatty acids and cholesterol in the liver cells of 3-month rats, accompanied by decreasing cholesterol excretion in the incubation medium. Short-term effects of thyroxine do not cause statistically significant changes in cholesterol and free fatty acids synthesis intensity in hepatocytes of 24-month-old rats.

Key words: thyroxine, aging, cholesterol, fatty acids.

Введение

Известно, что тиреоидные гормоны являются мощными регуляторами метаболизма липидов в гепатоцитах. Действие тиреоидных гормонов и, в частности, тироксина на клетки-мишени опосредуется ядерными рецепторными механизмами и развивается в промежутке времени от 24 часов до нескольких суток (Weinstein et al., 1994). В то же время, ряд эффектов тироксина может наблюдаться на более ранней стадии гормонального воздействия. Эти эффекты геном-независимы, опосредованы цитоплазматическими тиреоидными рецепторами и реализуются при участии локализованных в цитоплазме сигнальных каскадов (Babenko, Kavok, 1995; Кавок, Бабенко, 2001). В качестве наиболее вероятного негеномного пути трансдукции тиреоидного сигнала на сегодняшний день рассматривают фосфатидилинозитол-3-киназный (PI-3K) сигнальный путь. Для активации PI-3K пути цитоплазматический тироксиновый рецептор вступает во взаимодействие с p-85 α -субъединицей

фосфатидилинозитол-3-киназы, запускающей процессы фосфорилирования. В зависимости от конечного эффектора PI-3K пути, реализация тироксинового сигнала может осуществляться в короткие сроки, от нескольких минут до нескольких часов. Одним из конечных эффекторов тиреоидного сигнала в гепатоцитах является ERK1/2-киназа, которая способна активировать транскрипцию в ядре генов, ответственных за синтез некоторых ферментов липидного метаболизма. Таким образом, PI-3K путь может реализовывать сочетанные ядерно-цитоплазматические эффекты тиреоидных гормонов (Radeppe et al., 2008; Storey et al., 2006). Сигнальные цитоплазматические пути и, в частности, PI-3K участвуют в краткосрочной тиреоидной модуляции метаболизма липидов, входящих в состав клеточной мембраны, таких как холестерин и фосфолипиды. Исключительно важной представляется негеномная модуляция тироксином обмена холестерина, как структурообразующего компонента мембранных рафт – субдоменов, окружающих белковые рецепторы в плазматической мембране и определяющих их конформацию и функциональную активность (Gulbins, Li, 2006). Показано, что в интактных гепатоцитах тироксин вызывает кратковременную активацию анаболизма холестерина, наряду с повышением функциональной активности и экспрессии ключевого фермента липогенеза – синтазы жирных кислот, сопровождающуюся накоплением в клетке свободных жирных кислот (Radeppe et al., 2008). В то же время, рядом работ продемонстрированы нарушения трансдукции гормонального сигнала цитоплазматическими каскадами, ассоциированные со старением организма. Так, показано развитее с возрастом резистентности к инсулиновому и тиреоидному сигналам, как в гепатоцитах, так и в других типах клеток (Wu et al., 2009; Wang et al., 2009) в результате нарушений в функционировании PI-3K сигнального каскада. Изменения же в PI-3K-зависимых процессах обмена мембранных липидов при старении могут приводить к кумулятивным нарушениям сигналинга. Учитывая ведущую роль холестерина в организации субдоменной структуры плазматической мембраны, а, следовательно, и его участие в рецепции разнообразных межклеточных сигналов, целью данной работы было сравнительное исследование особенностей кратковременной модуляции тироксином липогенетических процессов в изолированных гепатоцитах молодых и старых самцов крыс и, в частности, тиреоидной регуляции синтеза холестерина и жирных кислот.

Материал и методика

В экспериментах использовали изолированные гепатоциты 3- и 24-месячных самцов крыс линии *Wistar*. Перед вскрытием брюшной полости животных наркотизировали диэтиловым эфиром. Гепатоциты выделяли по методу Петренко (Петренко и др., 1991). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью трипанового синего. Количество жизнеспособных клеток составляло 90–95 % от общего их числа.

Для определения активности внутриклеточных синтетических процессов под влиянием гормона гепатоциты инкубировали на протяжении 90 минут при 37°C в присутствии предшественника синтеза липидов – [¹⁴C]H₃COONa (25,4 мкКи/мл среды) и 60 минут в присутствии L-тироксина (Reanal) в концентрации 10⁻⁸ моль/л или с эквивалентным объемом 100 нМ NaOH (в качестве контроля), в бессывороточной инкубационной среде Хенкса 199. Клетки отмывали и ресуспендировали в буфере Кребс-Хенселейт с 0,1% альбумином. Реакцию останавливали добавлением охлажденной до 4°C смеси хлороформа с метанолом (1:2, об/об).

Экстракцию липидов осуществляли по методу Блай и Даер (Bligh, Dyer, 1959). Разделение липидов на фракции проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагеле в системе растворителей: гексан : диэтиловый эфир : ледяная уксусная кислота (36,5:12,5:1, об/об) для нейтральных липидов и холестерина. Липиды проявляли в парах йода и идентифицировали путем сравнения со стандартами. Количественное определение липидов в хроматографических фракциях проводили по методу Марч и Вейнстейн (March, Weinstein, 1966). Содержание белка в клетках определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Радиоактивность проб, содержащих меченые [¹⁴C]липиды, определяли с помощью счетчика радиоактивности БЭТА.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью дисперсионного анализа Анова.

Результаты и обсуждение

Установлено, что после 60-минутной инкубации изолированных гепатоцитов 3-месячных самцов крыс в присутствии тироксина содержание диацилглицеролов выросло на 16%, холестерина на 31% и триглицеридов на 37% (рис. 1). В то же время, содержание в клетках свободных жирных кислот не изменилось статистически значимо по отношению к контролю.

При краткосрочной инкубации с тироксином, в присутствии универсального предшественника синтеза липидов [¹⁴C]H₃COONa, гормон активирует в клетках синтез свободных жирных кислот и холестерина (табл. 1).

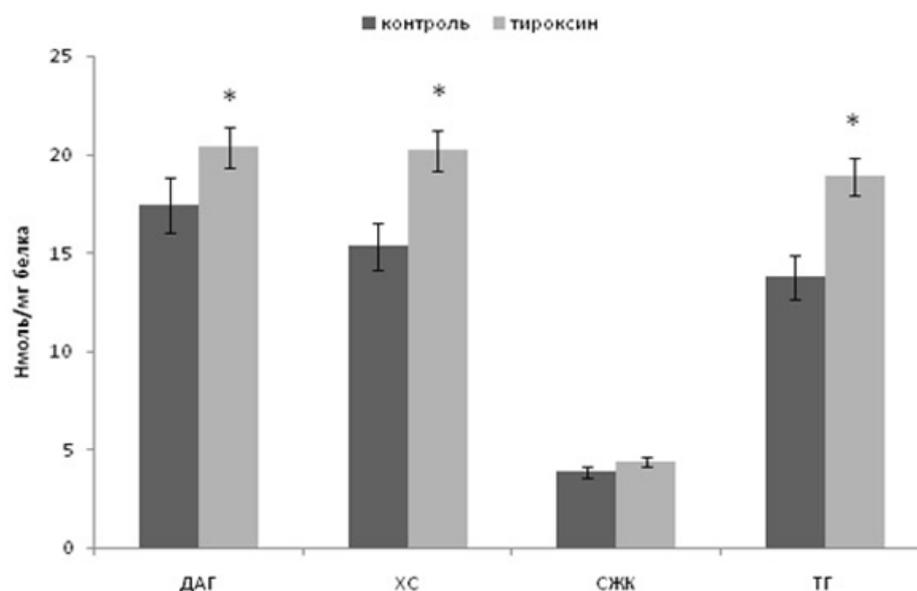


Рис. 1. Влияние тироксина на содержание диацилглицеролов (ДАГ), холестерина (ХС), свободных жирных кислот (СЖК) и триглицеридов (ТГ) в изолированных гепатоцитах 3-месячных крыс, через 60 минут инкубации с гормоном

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками.

Известно, что повышение уровня тиреоидных гормонов в крови препятствует развитию атеросклероза. Антиатерогенный эффект тироксина обусловлен участием гормона в регуляции синтеза и транспорта холестерина в печени. Длительное воздействие тироксина на организм снижает уровень свободного холестерина в плазме крови (Johansson et al., 2005). Исследование содержания холестерина в среде инкубации гепатоцитов показало, что тироксин в течение 60 минут снижает уровень вышедшего из клеток в среду холестерина на 12% по отношению к контролю (рис. 2).

Таблица 1.

Влияние тироксина на синтез холестерина и жирных кислот

| Условия эксперимента | Экспериментальные животные | | | |
|--------------------------|----------------------------|---------------|--------------|-------------|
| | 3-месячные | | 24-месячные | |
| | контроль | тироксин | контроль | тироксин |
| Холестерин | 109,25±5,09 | 130±2,97* | 355,76±8,32 | 367,34±5,12 |
| Свободные жирные кислоты | 903,7±29,88 | 1148,3±36,25* | 788,56±20,12 | 662,78±23,2 |

Примечания: данные представлены в импульсах/10⁸клеток·мин.; * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками.

Усиление под влиянием гормона синтеза холестерина на фоне снижения его экскреции в среду приводит к краткосрочному повышению содержания холестерина в гепатоцитах. Краткосрочные изменения содержания холестерина могут влиять на процессы сигналинга и регуляции липогенеза. Так, показано, что в клетках печени в активации ферментов липогенеза принимают участие не только тиреоидные гормоны, но и инсулин, синергетически взаимодействующий с ними. Одним из основных

мест депонирования холестерина в клетке является мембрана, в частности липидные рафты. Рафты играют важнейшую роль в процессах гормонального сигналинга, и от их структуры зависит функциональная активность погруженных в них белковых трансмембранных рецепторов. Холестерин стабилизирует структуру рафт и, тем самым, может регулировать чувствительность мембранных рецепторов к другим гормональным воздействиям (Gulbins, Li, 2006).

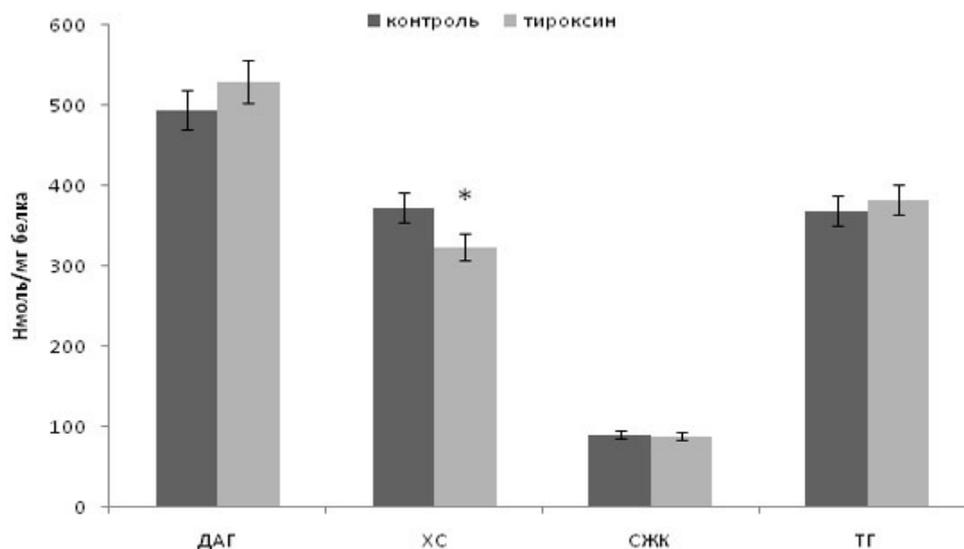


Рис. 2. Влияние тироксина на содержание диацилглицеролов (ДАГ), холестерина (ХС), свободных жирных кислот (СЖК) и триглицеридов (ТГ) в среде инкубации

*Примечание:** – $p < 0,05$ по сравнению с контрольными клетками.

Повышение содержания [^{14}C]-свободных жирных кислот в гепатоцитах под влиянием тироксина свидетельствует об активации процессов липогенеза в клетке. Как известно, ключевым ферментом липогенеза в гепатоцитах является синтаза жирных кислот. Короткое время реализации гормонального сигнала позволяет предполагать, что активация синтазы жирных кислот в данном эксперименте носит негеномный характер, что согласуется с литературными данными (Radenne et al., 2008). В то же время, известно, что жирные кислоты, накапливаясь в клетке, могут вызывать нарушения в метаболизме липидов, а также в процессах гормонального сигналинга. Показано, что повышение содержания свободных жирных кислот приводит к нарушению супрессии транспорта глюкозы в клетках печени под действием инсулина, что, по сути, является первичным проявлением инсулинорезистентности и может свидетельствовать о развитии сахарного диабета (Boden, 2008). Продемонстрировано непосредственное участие свободных жирных кислот, при повышении их внутриклеточного содержания, в индукции апоптических процессов в эндотелиальных клетках человека (Pigo et al., 2008). Для компенсации потенциально патогенных влияний повышенного содержания жирных кислот в живой клетке существует адаптивный механизм их включения в состав нейтральных липидов и фосфолипидов (Coleman, Lee, 2004). В настоящей работе установлено, что синтез жирных кислот в гепатоцитах под действием тироксина усиливается, в то время как их содержание не изменяется, вероятно, из-за высокой скорости включения вновь синтезированных жирных кислот в состав нейтральных липидов либо фосфолипидов.

В то же время, краткосрочная инкубация клеток с тироксином не приводит к статистически значимому, относительно контроля, повышению включения [^{14}C] в состав новообразованных свободных жирных кислот, триглицеридов и холестерина в гепатоцитах 24-месячных крыс (табл. 1), что может свидетельствовать о резистентности клеток печени старых крыс к быстрой тиреоидной регуляции липогенеза.

Исследования, проведенные на гепатоцитах старых крыс, свидетельствуют о развитии с возрастом нарушений в работе негеномных сигнальных каскадов, в частности, PI-3K сигнального пути (Wang et al., 2009). На сегодняшний день нарушения функциональной активности PI-3K каскада рассматривают в числе основных причин инсулинорезистентности, а также убедительно продемонстрирована ведущая роль PI-3K пути в трансдукции тиреоидного сигнала в гепатоцитах.

С возраст-ассоциированными альтерациями в работе PI-3K каскада могут быть связаны также и нарушения в тиреоидной регуляции липогенеза в клетках печени 24-месячных крыс.

Выводы

В результате исследования краткосрочной тиреоидной регуляции липогенеза в изолированных гепатоцитах 3- и 24-месячных самцов крыс линии *Wistar* показано, что тироксин вызывает быстрое накопление в клетке нейтральных липидов и холестерина, наряду с усилением синтеза холестерина и жирных кислот, а также угнетает экскрецию холестерина из клеток. В то же время, с возрастом клетки печени крыс приобретают резистентность к быстрым влияниям тироксина на регуляцию процессов липогенеза, что, вероятно, свидетельствует о связанном со старением нарушении механизмов быстрой передачи гормонального сигнала (Wu et al., 2009).

Список литературы

- Кавок Н.С., Бабенко Н.А. Возрастные особенности метаболизма глицеролипидов в печени крыс при кратковременном влиянии тироксина // Украинський біохімічний журнал. – 2001. – Т.73, №5. – С. 80–84.
- Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия. – 1991. – Т.56, вып.9. – С. 1647–1651.
- Babenko N.A., Kavok N.S. The effect of thyroid hormones, phorbol esters, and sphingosine on incorporation of linoleic acid in liver lipids of white rats // Biochemistry. – 1995. – Vol.60, №12. – P. 1545–1549.
- 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.
- Boden G. Obesity and free fatty acids (FFA) // Endocrinol. Metab. Clin. North Am. – 2008. – Vol.37, №3. – P.635.
- Coleman R.A., Lee D.P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation // Progress in Lipid Research. – 2004. – №43. – P. 134–176.
- Gulbins E., Li P.L. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2006. – Vol.290. – P. R11–R26.
- Johansson L., Rudling M., Scanlan T.S. et al. Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol.102, №29. – P. 10297–10302.
- 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.
- March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // J. Lipid. Res. – 1966. – Vol.7, №4. – P. 574–580.
- Piro S., Spampinato D., Spadaro L. et al. Direct apoptotic effects of free fatty acids on human endothelial cells // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. – 2008. – Vol.18, №2. – P. 96–104.
- Radenne A., Акпа М., 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.
- Storey N.M., Gentile S., Ullah H. et al. Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol.103, №13. – P. 5197–5201.
- Wang S., Meng Z.M., Li X.J. Effects of aging on the expressions of insulin receptor substrate-1, phosphate protein kinase B in rat liver and muscle // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. – 2009. – Vol.40, №3. – P. 426–429.
- Weinstein S.P., O'Boyle E., Fisher M., Haber R.S. Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system // Endocrinology. – 1994. – Vol.135, №2. – P. 649–654.
- Wu M., Katta A., Gadde M.K. et al. Aging-associated dysfunction of Akt/protein kinase B: S-nitrosylation and acetaminophen intervention // PLoS One. – 2009. – Vol.4, №7. (www.plosone.org)

Представлено: В.В.Давидовим / Presented by: V.V.Davydov

Рекомендовано до друку: Н.І.Буланкіною / Recommended for publishing by: N.I.Bulankina

Подано до редакції / Received: 21.01.2010.

© В.В.Гарькавенко, 2010
© V.V.Garkavenko, 2010