

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.1

© Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕЙТРАЛЬНОЙ И КИСЛОЙ ИЗОФОРМ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ В ГЕПАТОМЕ- 22, В РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ И ИШЕМИЗИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

А.В. АЛЕСЕНКО^{1*}, Е.С. ЗУБОВА¹, Л.Б. ДУДНИК¹, Э. И. ГАЛЬПЕРИН²,
Л.В. ПЛАТОНОВА², Н. ШОНО², А.Ю. ЧЕВОКИН², Э.В. ДЯТЛОВИЦКАЯ³

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН 117977 Москва,
ул Косыгина 4, факс: 137 4101, email: aless@center.chph.ras.ru

²Медицинская Академия им. Сеченова, Москва, ул. Б. Пироговская д.6,

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН 117871 Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

Исследованы активности нейтральной и кислой форм сфингомиелиназ в регенерирующей печени крыс после частичной гепатэктомии (в течение 48 час после операции), ишемии печени крыс (15, 30 мин, 1 и 2 час) и последующей реперфузии (от 5 мин до 2 час), а также в гепатоме 22 мышей через 15 дней развития опухоли и в печени опухоленосителя. Показано, что активность нейтральной сфингомиелиназы увеличивается в гепатоме и в регенерирующей печени и снижается в ишемизированном органе. Реперфузия органа в зависимости от срока ишемии и реперфузии нормализует активность фермента. Активность кислой изоформы фермента снижается в опухоли, не изменяется в регенерирующей печени и повышается при длительных сроках ишемии. Можно предположить, что нейтральная СФМаза вовлечена преимущественно в пролиферативные процессы, а кислая СФМаза связана с повреждением клеточных структур.

Ключевые слова: сфингомиелиназа, сфингомиелиновый цикл, регенерация печени, ишемия печени, опухоль, гепатома 22

ВВЕДЕНИЕ. Сфингомиелиновый цикл включает ферментативный гидролиз сфингомиелина и генерацию церамида и сфингозина, которые участвуют в передаче сигнала клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [1 -3].

СФМ цикл инициируется посредством активации нескольких изоформ сфингомиелиназы (КФ 3.1.4.12, сфингомиелингидролазы). Каждый тип

сфингомиелиназы гидролизует сфингомиелин с образованием церамида и фосфохолина. СФМаза обнаружена практически во всех клетках, но наибольшее количество ее содержится в клетках мозга (в миелине) [4].

В современной литературе известно пять типов сфингомиелиназ, которые отличаются внутриклеточной локализацией, оптимальным рН, зависимостью от катионов и ролью в клеточной регуляции. Была клонирована лизосомальная кислая СФМаза и получены к ней моноклональные антитела [5]. Это фермент активируется при взаимодействии FAS-лиганда с FAS рецептором [6] и радиацией [7]. Совсем недавно была клонирована нейтральная, Mg^{2+} -зависимая СФМаза мыши и человека; её свойства [8] совпадают со свойствами нейтральной сфингомиелиназы, локализованной в клеточной мембране [6, 9].

Как было показано ранее, активация фермента связана с процессами пролиферации и дифференцировки клеток и индукции апоптоза [3, 6, 9]. Относительно немного известно о биологических свойствах трех других сфингомиелиназ - цинк-зависимой лизосомальной кислой СФМазе [10], Mg^{2+} -независимой нейтральной СФМазе [11] и щелочной СФМазе [12]. Первые два фермента были найдены во всех типах тканей, однако их максимальная активность связана с мозгом [6]. Щелочная сфингомиелиназа обнаружена в клетках желудочно-кишечного тракта, и изменения в ее активности связаны с индукцией опухолей желудка и кишечника [12].

Исследование внутриклеточного распределения сфингомиелиназ показало, что кислая форма фермента присуща в основном лизосомам [13]. Оптимум активности лизосомальной СФМазы лежит в интервале рН 4,4 - 4,8. В этой области активность кислой СФМазы не зависит от двухвалентных ионов и даже ингибируется ионами Mg^{2+} . В области рН 5,0 - 7,5 активность кислой СФМазы зависит от двухвалентных ионов, хотя активация не является специфичной: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} активируют СФМазу в равной степени. Лизосомальная СФМаза не ингибируется сульфгидрильными ингибиторами и ионами Hg^{2+} [14]. В то же время фосфолипиды - фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и фосфатидилинозит - подавляют активность кислой СФМазы [15]. Дефицит именно этой формы СФМазы приводит к возникновению ряда заболеваний центральной нервной системы.

Нейтральная СФМаза является мембраносвязанным и Mg^{2+} , Mn^{2+} -зависимым ферментом [16]. Ядра клеток также содержат нейтральную сфингомиелиназу [3]. На ее активность оказывают влияние также ДМСО [17], летучие анестетики [18], фосфолипиды [19]. Из фосфолипидов наибольшим активирующим действием обладает фосфатидилсерин [19, 20] несколько меньшим - фосфатидная кислота и фосфатидилинозит. Фосфатидилэтаноламин оказывает слабое активирующее действие, а фосфатидилхолин вообще не влияет на активность нейтральной СФМазы [19]. Ионы ртути, сульфгидрильные соединения являются сильными ингибиторами нейтральной СФМазы [16].

Другая форма нейтральной СФМазы (pH_{opt} 7,0) не зависит от двухвалентных катионов [11]. Основная ее активность была обнаружена в миелиновых фракциях. Поскольку эта форма сфингомиелиназы в процессах проведения сигналов не участвует, и, как правило, уровень ее активности по сравнению с Mg^{2+} -зависимой изоформой фермента невелик, то обычно ее активность не учитывают в исследованиях данного типа. Специфичность

распределения щелочной изоформы СФМазы в клетках желудочно-кишечного тракта также вызывает ограниченный интерес у исследователей.

Таким образом, наиболее значимыми в процессах пролиферации и апоптозе являются две изоформы фермента - кислая СФМаза и Mg^{2+} -зависимая СФМаза.

Активность именно этих двух ферментов мы изучали при различных воздействиях на печень - оперативное вмешательство, сопровождающееся частичной резекцией и созданием ишемических повреждений с последующей реперфузией органа, а также в процессе роста опухоли, имеющей печеночное происхождение - гепатомы 22, растущей подкожно и в печени животного-опухоленосителя.

МЕТОДИКА. Определение сфингомиелиназной активности.

Активности нейтральной и кислой изоформ сфингомиелиназы в клетках печени и опухоли определяли по методу Hostetler и Yazaki. [20].

В качестве субстрата для определения активности фермента использовали [N-метил- ^{14}C] сфингомиелин с удельной активностью 58 мКи/мМоль. Инкубационная среда для определения активности нейтральной сфингомиелиназы содержала 50 мМ трис-HCl, pH 7,4, 10 мМ $MgCl_2$, 1 мМ ЭДТА, 0,25 % Тритон X-100, 50 мкМ меченого сфингомиелина (отношение меченый:немеченый сфингомиелин 1:10) и 2-3 мг белка гомогената. Объем пробы составлял 0,8 мл. Для определения активности кислой сфингомиелиназы инкубационная смесь вместо нейтрального буфера содержала цитратный буфер (pH 5,0). Все остальные процедуры для обеих изоформ фермента были идентичны.

Об активности сфингомиелиназы судили по переходу метки в виде водорастворимого продукта реакции [^{14}C]-холинфосфата в водно-метанольную фазу. Радиоактивность определяли в аликвоте верхней, водно-метанольной фазы на счетчике Delta (Нидерланды). Удельную активность рассчитывали на мг белка.

Операцию по частичной гепатэктомии проводили на самках крыс линии Вистар весом 200-250г по методике, разработанной Higgins и Anderson [21], под эфирным наркозом. При 60%-ной резекции удалялись срединная, правая и правая боковая доли. Через 1, 3, 6, 12, 24 ч животным проводили релапаротомию, канюлировали воротную вену и промывали через нее оставшуюся часть печени охлажденным до 4° физиологическим раствором. После перфузии печень иссекали и сразу же помещали на лед. На каждую экспериментальную точку было использовано 3 крысы. Опыт был повторен дважды.

Синтез ДНК в регенерирующей печени анализировали по включению 3H -тимидина. 200 мКи 5-метил- 3H -тимидина (удельная радиоактивность 15 Ки/ммоль) вводили животным за 30 мин до декапитации. Количество ДНК в ткани печени определяли по методу Мармура.

Ишемию печени, захватывающей 40% органа, проводили на крысах Wistar весом 250-300 г натошак. Срединную лапаротомию выполняли под наркозом (внутривенное введение бриетала в дозе 50мг/кг веса). Ишемию создавали наложением микрозажима на основание левой боковой доли печени с пережатием сосудистой ножки транспаренхиматозно. На время ишемии рану закрывали асептической повязкой, смачивая первый слой физраствором. Зажим снимали через 15-120 мин. Время реперфузии составляло от 5 до 120 мин. У

животных канюлировали воротную вену и промывали печень охлажденным физраствором. После перфузии ишемизированную долю печени иссекали и помещали на лед.

Клетки перевиваемой гепатомы-22 вводили подкожно самкам мышей линии СЗН весом 18-20 г. Опухоль извлекали на 15 день после перевивки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ *Активность нейтральной и кислой сфингомиелиназ в гепатоме- 22 и печени опухоленосителя.*

Активность нейтральной и кислой сфингомиелиназ определяли в перевиваемой гепатоме 22 мышей на 15 день развития опухоли, в печени животных-опухоленосителей и в печени интактных животных. Как видно из табл., активность нейтральной сфингомиелиназы резко увеличивается в гепатоме, превышая уровень активности фермента в нормальной печени в 6,5.раза. В печени животного-опухоленосителя активность фермента также увеличивается в сравнении с интактной печенью, однако менее значительно, чем в гепатоме (в 2,5 раза). Активность кислой сфингомиелиназы меняется в гепатоме и в печени опухоленосителя противоположным образом. В гепатоме активность фермента резко падает и составляет только четвертую часть от уровня активности фермента в интактной печени; в печени опухоленосителя обнаружен подъем, однако менее значительный (в 1,7 раза по сравнению с интактной печенью), чем для нейтральной сфингомиелиназы. Таким образом, в печени опухоленосителя активности обеих изоформ фермента увеличиваются, а в гепатоме активность нейтральной сфингомиелиназы резко увеличивается, а кислой - значительно уменьшается.

Таблица. Изменение активности нейтральной и кислой сфингомиелиназ в нормальной печени мышей, печени опухоленосителя и гепатоме 22

Ткань	Нейтральная сфингомиелиназа (% нормы)	Кислая сфингомиелиназа (% нормы)
Нормальная печень	100	100
Печень опухоленосителя	258±53*	179±39*
Гепатома-22	647±63*	24±6*

*- $p \leq 0,01$

Из наших данных следует, что клетки гепатомы и клетки печени, находящиеся под контролем этой гепатомы, имеют некоторые различия в метаболизме сфинголипидов. По всей видимости, сигналы клеточной пролиферации, реализуемые посредством сфингомиелинового цикла, различаются для опухоли и органов, которые испытывают ее влияние, но еще не утратили полностью своих нормальных функций.

Полученные результаты для гепатомы отличаются об известных данных об изменении сфингомиелиназной активности в других опухолях. Ранее было показано, что в карциноме толстой кишки человека активность нейтральной, кислой и щелочной изоформ сфингомиелиназы значительно падает [12]. В аналогичной опухоли крыс, индуцируемой канцерогенами, активность нейтральной сфингомиелиназы также уменьшается [22]. Эти отличия свидетельствуют о том, что изменение сфингомиелиназной активности зависит

как от типа опухоли, так и, возможно, от сроков ее развития, что определяет скорость клеточной пролиферации в опухоли.

Согласно недавно опубликованным данным, нейтральная и кислая изоформы сфингомиелиназы участвуют в разных биохимических процессах, происходящих в клетке [23]. При этом ряд авторов полагают, что в регуляции апоптоза участвуют церамиды, образующиеся в результате действия кислой сфингомиелиназы [23]. Данные, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о резком снижении активности кислой сфингомиелиназы в гепатоме-22, а следовательно и о возможном уменьшении генерируемых с ее помощью церамидов, что может привести к торможению апоптоза опухолевых клеток.

Изменение сфингомиелиназной активности в клетках регенерирующей печени. Регенерирующая печень - очень удобная модель для изучения различных биохимических процессов, протекающих в делящейся интактной клетке. При удалении 2/3 печени пролиферативная реакция захватывает всю оставшуюся печень. Начиная с момента операции наблюдается повышение синтеза РНК, максимум которого для регенерирующей печени крысы приходится на 4-8 час после операции. Включение синтеза ДНК отмечается через 16 ч, а через 20-22 ч наблюдается максимум ДНК-синтезирующей активности (рис. 1, кривая 1).

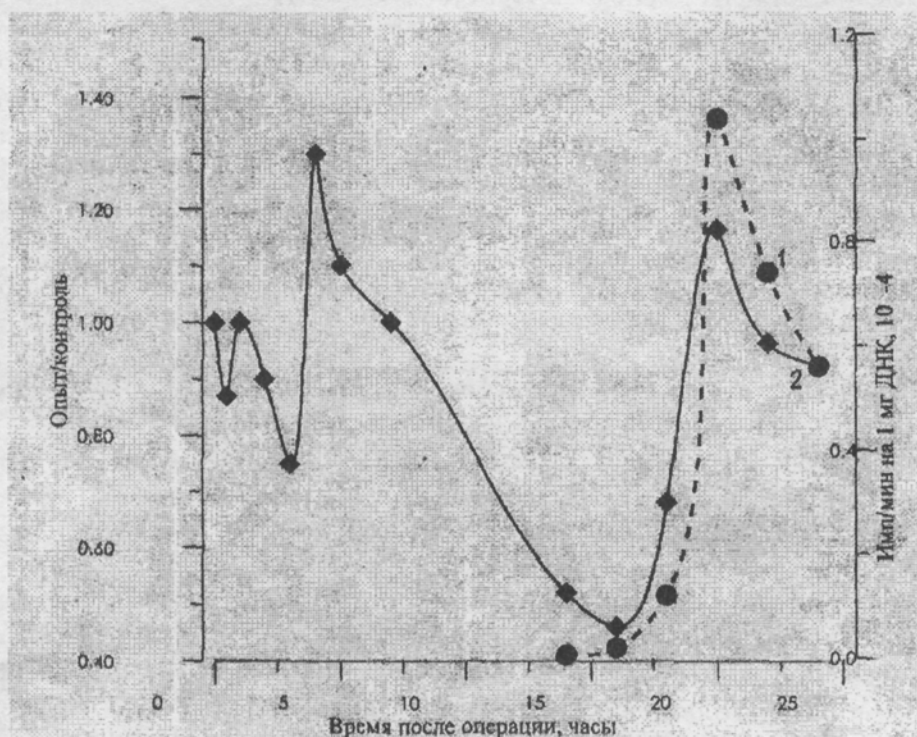


Рисунок 1.

Изменение активности нейтральной сфингомиелиназы (1) и синтеза ДНК (2) в регенерирующей печени крыс

В период стимуляции процесса пролиферации в регенерирующей печени наблюдается резкое изменение активности сфингомиелиназы (рис. 1, кривая 2), пики которой отмечены через 4 и 20 ч после операции, т.е. в области

максимального синтеза нуклеиновых кислот клетками регенерирующей печени. В промежутке между этими сроками активность фермента резко снижается. Изменения активности кислой сфингомиелиназы в регенерирующей печени нами отмечены не были.

Часто регенерирующая печень служит сравнительным объектом при изучении разнообразных процессов в нормально пролиферирующих клетках и в клетках опухоли. Мы также можем отметить некоторое сходство в изменении активности нейтральной сфингомиелиназы, которая активируется как в регенерирующей печени, так и в гепатоме и в печени опухоленосителя, но в опухоли этот процесс более выражен. Кислая СФМаза, напротив, не изменяется в пролиферирующих нормальных клетках, но в опухоли ее активность падает, а в печени опухоленосителя активность фермента растет. Можно высказать предположение, что активация нейтральной СФМазы скорее всего определяет пролиферативные процессы, а ингибирование кислой изоформы связано с развитием злокачественного перерождения клетки.

Изменение активности сфингомиелиназы в ишемизированной печени.

Известно, что опухоль характеризуется повышенными ангиогенезом и циркуляцией крови. Для ишемии, напротив, свойственно снижение или прекращение кровотока в ткани или органе. В наших экспериментах было изучено изменение активности нейтральной и кислой сфингомиелиназ в печени с ишемией в 15, 30 мин и 1 и 2 час и последующей реперфузией от 5 мин до 2 час печени с вышеуказанными сроками ишемии.



Рисунок 2.

Изменение активности нейтральной (1) и кислой (2) сфингомиелиназ в ишемизированной печени крыс.

Активность нейтральной СФМазы уменьшается к 30 мин и ее значения были зафиксированы ниже контрольного уровня в течение 2 ч ишемии (рис. 2, кривая 1). 5- и 10-минутная реперфузия печени, подвергнутой 15 мин ишемии,

вызывает повышение активности фермента (рис.3). При более длительных сроках ишемии также наблюдается увеличение активности нейтральной СФМазы после реперфузии по сравнению с ишемизированной печенью, однако при 1 и 2-х ч ишемии реперфузия приводит к резкой активации фермента, а затем к нормализации его активности (рис. 3).

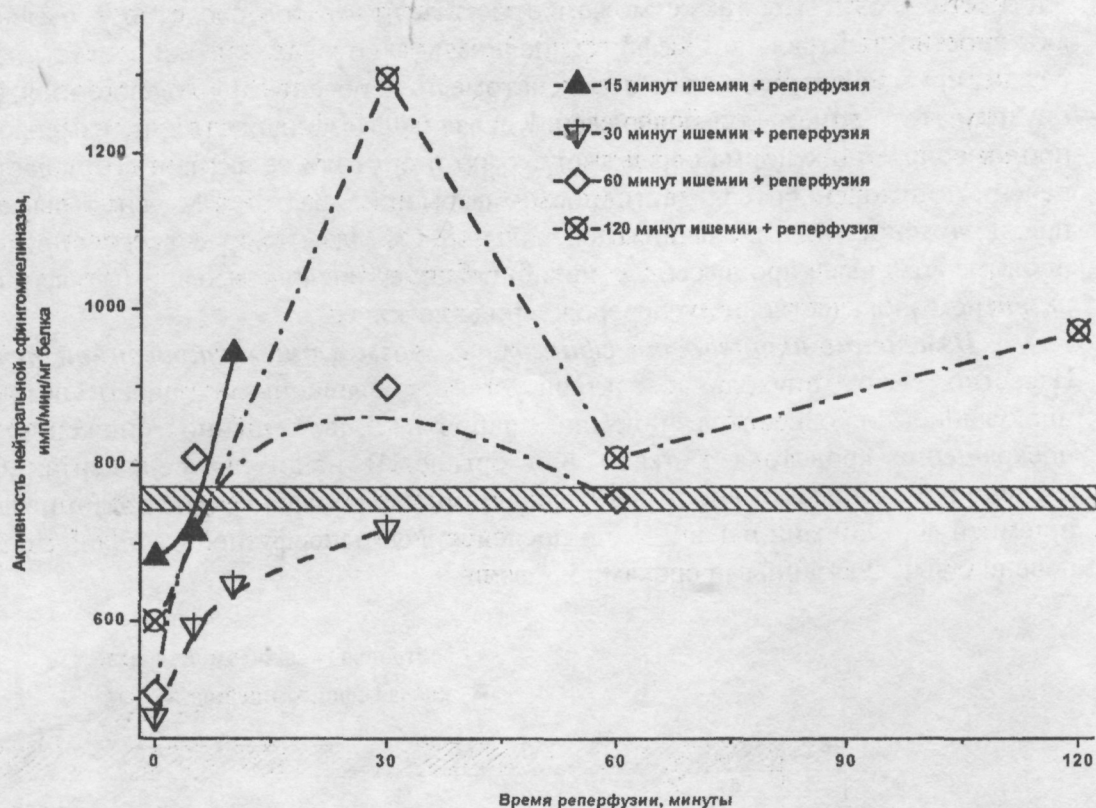


Рисунок 3.

Изменение активности нейтральной сфингомиелиназы на разные сроки реперфузии после 15 мин (1), 30 мин (2), 1 час (3) и 2 час (4) ишемии печени крыс.

Таким образом, нарушение кровоснабжения органа приводит к падению активности нейтральной СФМазы, а восстановление кровотока, особенно в течение продолжительного времени увеличивает активность фермента.

Кислая СФМаза при ишемии снижается в течение 30 мин и превышает контрольные значения через 1 и 2 час ишемии (рис.2, кривая 2). Это означает, что при длительных сроках ишемии активируется лизосомальная форма фермента, приводящая к разрушению СФМ, локализованного внутри клетки. 10-минутная реперфузия нормализует активность лизосомального фермента только на малые сроки ишемии (15 мин) (рис. 4). После 2 час ишемии 30-минутная реперфузия вызывает нормализацию активности фермента, а реперфузия в течение 2 ч после 2 ч ишемии не приводит к снижению активности фермента до контрольного уровня (рис.4).

Таким образом, в противоположность опухолевому процессу при ишемии снижается активность нейтральной сфингомиелиназы, а изменение активности

кислой СФМазы носит двухфазный характер: на ранних сроках ишемии - падает, а на больших (1-2 час) - растет. Активация фермента, локализованного в лизосомах, при длительных сроках ишемии скорее всего связана с разрушением клеток, подвергнутых стойкой ишемии. В опухоли этот процесс не наблюдается и там активность кислой СФМазы резко снижена.

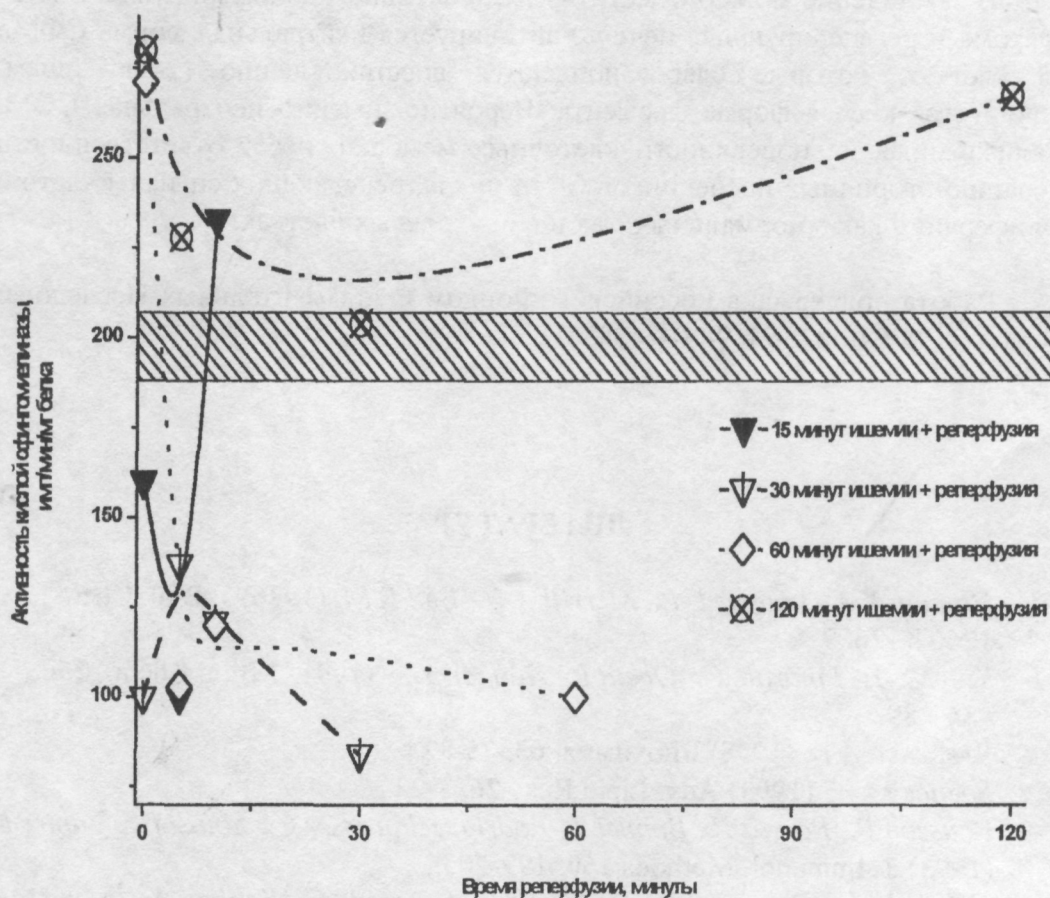


Рисунок 4.

Изменение активности кислой сфингомиелиназы на разные сроки реперфузии после 15 мин (1), 30 мин (2), 1 час (3) и 2 час (4) ишемии печени крыс.

При анализе СФМазной активности в ишемизированных (45 мин) с последующей реперфузией (30, 90 и 24 ч) почках также было отмечено снижение активностей обеих изоформ СФМаз [24] как при ишемии, так и при длительной реперфузии, однако авторы не исследовали активность ферментов в широком временном диапазоне ишемии. В нашем случае также при 30 мин ишемии активность ферментов снижается, а при длительных сроках ишемии приближается к контрольным значениям (см. рис 4). Увеличение количества церамида, зафиксированное авторами цитируемой работы, может быть связано с промежуточной фазой активации фермента, которую авторы в своих экспериментах не зарегистрировали. Резкое повышение содержания церамида в ишемизированной области сердца крысы [25] наблюдали через 3,5 ч ишемии и после 3 ч реперфузии сердца, перенесшего 30 мин ишемию. Согласно нашим

данным, именно после 2 ч ишемии значительно активируется кислая СФМаза и увеличивается активность нейтральной после длительной реперфузии. Таким образом, полученные нами данные (ишемия печени) согласуются с данными других авторов, исследующих другие ишемизированные органы (ишемия почки и сердца).

В заключение можно отметить, что в активно пролиферирующих клетках (гепатома и регенерирующая печень) активируется нейтральная форма СФМазы, а в клетках, которые слабо поддаются восстановлению (2-час ишемия), активируется кислая форма фермента. Вероятно, именно нейтральная СФМаза, локализованная на поверхности клеточных мембран, несет ответственность за генерацию вторичных посредников СФМ цикла, передающих сигналы клеточной пролиферации как в нормальных, так и в опухолевых клетках.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проекты N98-04-48256 и 98-04-48888)

ЛИТЕРАТУРА

1. Hannun Y.A., Loomis L.R., Merrill A.H., Bell R.M. (1986) J. Biol. Chem., **269**, 12604-12609.
2. Kim M.-Y., Linardic C., Obeid L., Hannun Y.A. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 484-489.
3. Алесенко А.В. (1998) Биохимия. **63**, 75-82
4. Spence M.W. (1993) Adv. Lipid Res., **26**, 3-23.
5. Rousson R., Parvaz P., Bonnet J., Rodriguezlafrasser C., Louisot P. Vanier M.T. (1993) J. Immunol. Methods, **160**, 199-206.
6. Cifone M.G., Roncaioli P., De Maria R., Camarda G., Santoni A., Ruberti G., Testi R. (1995) EMBO J., **14**, 5859-5863.
7. Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari, F.A., Traylor, R.S., Gewirtz, D.A., and Grant, S. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **91**, 73-75.
8. Tomiuk S., Hofmann K., Nix M., Zumbansen M., Stoffel W. (1998) **95**, 3638-3643.
9. Wolff R.A., Dobrowsky R.T., Bielawska A., Obeid L.M., Hannun Y.A. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 19605-19609.
10. Schissel S.L., Keesler G.A., Schuchman E.H., Williams K.J. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 18250-18259.
11. Okazaki T., Bielawska A., Domae N., Bell R.M., Hannun Y.A. (1994) J. Biol. Chem., **269**, 4070-4077.
12. Hertervig E., Nilsson A., Nyberg L., Duan R.D. (1997) Cancer, **79**, 448-453
13. Sutrina S.L., Chen W.W. (1984) Biochim. Biophys. Acta, **793**, 169-179.
14. Poulos A., Ranieri E., Shankaran P., Callahan J.W. (1984) Biochim Biophys Acta, **793**, 141-149.
15. Barnholz Y., Roitman A., Gatt S. (1966) J. Biol. Chem., **241**, 3731-3737.
16. Bartolf M., Franson R.C. (1986) J. Lipid Res., **27**, 57-63.

17. Sakuragawa N., Sato M., Yoshida Y., Kamo I., Arima M., Satoyoshi E. (1985) *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **126**, 756-762.
18. Mooibrock M.J., Cook H.W., Clarke J.T.R., Spence M.W. (1985) *J. Neurochem.*, **44**, 1551-1558.
19. Tamiya-Koizumi K., Kojima K. (1986) *J. Biochem.*, **99**, 1803-1806.
20. Hostetler K.Y., Yazaki P.J. (1979) *Brain Res.*, **20**, 456-460.
21. Higgins G.M., Anderson R.M. (1931) *Arch. Pathol.*, **12**, 186-202.
22. Dubeja P.K., Dahiya R., Brasitus T.A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **863**, 309-312.
23. Haimovitz-Friedman A., Kolesnick R.N., Fuks Z. (1997) *British Med. Bull.*, **53**, 539-553.
24. Zager R.A., Iwata M., Conrad D.S., Burhart K.M., Igarashi Y. (1997) *Kidney Int.*, **52**, 60-70.
25. Bielawska A.E., Shapiro J.P., Jiang L., Melkonyan H.S., Piot C., Wolfe C.L., Tomei L.D., Hannun Y.A., Umansky S.R. (1997) *Am. J. Pathol.*, **151**, 1257-1263.

Поступила 18.10.99.

CHANGES IN THE ACTIVITY OF NEUTRAL AND ACIDIC ISOFORMES OF SPHINGOMYELINASE IN HEPATOMA-22, REGENERATING AND ISCHEMIC LIVER

A.V. ALESSENKO¹, E.S. ZUBOVA¹, L.B. DUDNIK¹, E.I. GALPERIN², L.V.
PLATONOVA², N. SHONO², A.YU. CHEVOKIN², E.V. DYATLOVITSKAYA³

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, ul Kosygin, 4
Moscow 117977 fax 137 4101

²Sechenov Moscow Medical Academy, ul B. Pirogovskaya, 2 Moscow 119435

³Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of
Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow 117871 GSP-7

Activity of neutral and acidic sphingomyelinases (N- and A-SMases) were studied in regenerating liver after partial hepatectomy (during 48 hrs after operation), in ischemic liver during 15, 30 min and 1 and 2 hrs ischemia and during following reperfusion (from 5 min up to 2 hrs), in hepatoma- 22 after 15 days of transplantation and in liver of tumor bearing animals. It was shown that activity of N-SMase is increased in hepatoma-22 and in regenerating liver and it is decreased in ischemic liver. Following reperfusion of ischemic liver area activity of enzyme was found to have returned to baseline in dependence on time of ischemia and reperfusion. Activity of A-SMase is decreased in tumor, is not changed in regenerating liver and increased after long time of ischemia. It was supposed that N-SMase is involved in cell proliferation, but A-SMase is connected with cell damage.

Key words: sphingomyelinase, sphingomyelin cycle, liver regeneration, liver ischemia, tumor, hepatoma-22