

## ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА ФОСФОЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Э.В. САПРЫКИНА, Ю.А. КОЗЛОВ, Н.В. СОСНИЦА, А.Н. БАЙКОВ, В.В. НОВИЦКИЙ

ЦНИЛ Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск

У мышей-самцов BALB/c с подострым аллоксановым диабетом (концентрация глюкозы в крови не ниже 14 ммоль/л) при исследовании метаболизма фосфолипидов в печени по скорости включения  $^3\text{H}$ -ацетата и  $^{14}\text{C}$ -пальмитата в соответствующие хроматографические фосфолипидные фракции найдено существенное снижение скорости обновления фосфатидных кислот (ФК), полиглицерофосфатов (ПГФ) и их лизосоединений (ЛПГФ), сфингомиелина (СМ) и лизофосфатидилхолина (ЛФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА). Скорость обновления фосфатидилхолина (ФХ), напротив, достоверно возрастала. Количество основных структурных фосфолипидных компонентов клеточных мембран гепатоцитов - ФЭА и ФХ - оказалось сниженным соответственно на 41 и 32% ( $P < 0,01$ ). В меньшей степени уменьшался уровень ЛПГФ и ФК ( $P < 0,05$ ). Содержание ПГФ, СМ, фосфатидилинозитола и ЛФХ существенно не отличалось от такового в контроле.

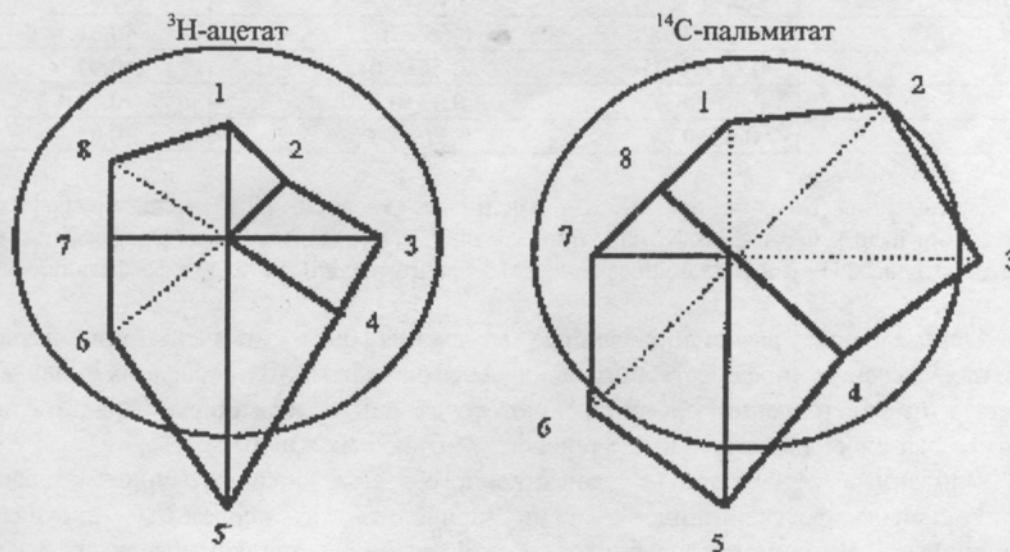
**Ключевые слова:** синтез фосфолипидов, печень мыши, аллоксановый диабет.

**ВВЕДЕНИЕ.** Ранее в нашей лаборатории было установлено, что при экспериментальном аллоксановом диабете в печени и в органах гемопозза (селезенка, тимус, илеоцекальные лимфоузлы) изменяется метаболизм нейтральных липидов, изучавшийся по включению  $^3\text{H}$ -ацетата и  $^{14}\text{C}$ -пальмитата [1]. Для дальнейшего исследования особенностей нарушения липидного обмена при этой эндокринопатии несомненный интерес представляет метаболизм фосфолипидов, поскольку хорошо известно, что последние не только участвуют в организации и функционировании клеточных и субклеточных структур различных органов и тканей, но также влияют на процессы транспорта ионов и субстратов (в том числе - глюкозы), активность мембрано-связанных ферментов, определяют их чувствительность к действию гормонов [2, 3, 4].

**МЕТОДИКА.** Эксперименты выполнены на 30 мышах-самцах линии BALB/c массой 18-20 г (питомник "Рассвет", НПО "Вирион", г. Томск), из них 15 мышей составляли контрольную группу (интактных) и столько же - группу животных с подострым 3-недельным аллоксановым диабетом (концентрация глюкозы в крови натошак не ниже 14 ммоль/л). Диабет вызывали однократным подкожным введением четырех - процентного раствора аллоксангидрата ("Лахема-Хеманол", Чехословакия) в дозе 400 мг/кг. О метаболизме фосфолипидов судили по качественному [11] и количественному [6] их составу, а также по включению меченых предшественников - уксусной кислоты-1,2- $^3\text{H}$  (мол. акт. 1,3 ТБк/моль) и [1- $^{14}\text{C}$ ]-пальмитиновой кислоты (мол. акт. 1,7 ТБк/моль) (В/О "Изотоп") - по ранее опубликованному методу [1, 7]. Липидный экстракт из печени получали по методу [9]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью "t-критерия" Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Полученные результаты не позволили выявить существенных (статистически значимых) сдвигов в содержании суммарных фосфолипидов в ткани печени у мышей с аллоксановым диабетом (табл. 1), несмотря на заметную тенденцию к их снижению по сравнению с соответствующим уровнем у интактных животных. В то же время при изучении содержания отдельных фосфолипидных компонентов обнаруживались определённые межфракционные изменения. Так, количество основных ингредиентов клеточных мембран фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина оказалось сниженным соответственно на 41 и 32% ( $P < 0,01$ ). В меньшей степени уменьшался уровень лизополиглицерофосфатов (ЛПГФ) и фосфатидных кислот (ФК) ( $P < 0,05$ ). Содержание же полиглицерофосфатов (ПГФ), сфингомиелина и лизофосфатидилхолина существенно не отличалось от такового в контроле. Более значительные сдвиги в синтезе фосфолипидов печени у животных с аллоксановым диабетом были выявлены с помощью меченых предшественников -  $^3\text{H}$ -ацетата и  $^{14}\text{C}$ -пальмитата (рис.). Так, включение  $^3\text{H}$ -ацетата в полиглицерофосфаты было снижено на 60%. На 34 и 24% соответственно угнеталось включение  $^3\text{H}$ -ацетата и  $^{14}\text{C}$ -пальмитата в лизосоединения полиглицерофосфатов.

Можно полагать, что нарушение образования ПГФ и ЛПГФ является результатом снижения процессов конденсации ФК, обусловленным подавлением их синтеза в ткани печени при диабете, о чём свидетельствуют данные литературы [10], а также установленный в настоящем исследовании факт угнетения включения  $^3\text{H}$ -ацетата (на 60%) и  $^{14}\text{C}$ -пальмитата (на 26%) в ФК (рис. 1).



Рисунок

Относительные скорости обновления различных фосфолипидных фракций в печени мышей с аллоксановым диабетом: 1 - ФК, 2 - ПГФ, 3 - ФЭА, 4 - ЛПГФ, 5 - ФХ, 6 - ФИ, 7 - СМ, 8 - ЛФХ. За 100% приняты показатели интактных мышей (окружности). Достоверные различия показателей обозначены сплошными радиусами ( $P < 0,05$ ).

Опыты с мечеными предшественниками позволили выявить в ткани печени у мышей с аллоксановым диабетом также значительные нарушения в образовании сфингомиелина. Включение меченых ацетата и пальмитата во фракцию этого фосфолипида было снижено на 50% по сравнению с интактными животными. Как полагает Т. О. Саатов [4], это может способствовать снижению чувствительности клеток к инсулину.

Значительное уменьшение скорости обновления фосфолипидов в печени диабетических животных было зафиксировано также и для лизофосфатидилхолина. Включение меченого ацетата и пальмитата в эту фосфолипидную фракцию при аллоксановом диабете снижалось соответственно на 25 и 50%. Важно при этом подчеркнуть, что параллельно со снижением в печени мышей с аллоксановым диабетом абсолютного количества фосфатидилхолина (табл. 1), который составляет большую часть внешнего слоя липидов клеточных и субклеточных мембран, отмечалось более интенсивное использование в его синтезе как ацетата (на 20%), так и пальмитата (на 45%). Последнее свидетельствует, по всей вероятности, о повышенной скорости обновления указанного фосфолипида, возможно, за счёт его более быстрого выведения из печени. Кроме того у животных данной группы было снижено использование ацетата для образования фосфатидилэтаноламина, отличающегося, как известно, высоким содержанием полиеновых жирных кислот.

Таблица 1. Содержание фосфолипидов (в мг/г ткани) в печени у мышей с аллоксановым диабетом,  $\bar{X} \pm t$

Показатель	Интактные мыши (n = 15)	Мыши с диабетом (n = 15)	P
Общие фосфолипиды	4,73 ± 0,41	3,60 ± 0,43	>0,05
ФК	0,47 ± 0,04	0,35 ± 0,04	<0,051
ПГФ	0,46 ± 0,06	0,44 ± 0,05	>0,05
ФЭА	0,97 ± 0,10	0,58 ± 0,06	<0,01
ЛПГФ	0,56 ± 0,04	0,45 ± 0,03	<0,05
ФХ	0,97 ± 0,08	0,66 ± 0,05	<0,01
ФМ	0,42 ± 0,05	0,35 ± 0,04	>0,05
ОМ	0,40 ± 0,05	0,33 ± 0,04	>0,05
ЛФХ	0,45 ± 0,04	0,37 ± 0,03	>0,05

Примечание. Сокращения: ФК - фосфатидные кислоты, ПГФ - полиглицерофосфаты (кардиолипин и др.), ФЭА - фосфатидилэтаноламин, ЛПГФ - лизополиглицерофосфаты, ФХ - фосфатидилхолин, ФИ - фосфатидилинозитол, СМ - сфингомиелин, ЛФХ - лизофосфатидилхолин.

Определённые разнонаправленные изменения были отмечены при изучении включения меченых предшественников в фосфоинозиты. В последних количество  $^3\text{H}$ -ацетата имело тенденцию к снижению, тогда как содержание  $^{14}\text{C}$ -пальмитатата, напротив, оказалось несколько выше такового у интактных животных.

Найденные изменения качественного и количественного состава индивидуальных фосфолипидов могут приводить к серьёзным нарушениям функциональной активности гепатоцитов. В этой связи представляют интерес результаты анализа соотношения между суммой нейтральных фосфолипидов (лизофосфатидилхолин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и сфингомиелин) и кислых (полиглицерофосфаты, их лизосоединения, инозитфосфатиды и фосфатидные кислоты). Полученные результаты показывают, что это соотношение у мышей с диабетом увеличивалось почти в 2 раза по сравнению с нормой за счёт, главным образом, уменьшения количества кислых фосфолипидов, обладающих, как известно, высокой степенью метаболической активности.

Таким образом, аллоксановый диабет у мышей может сопровождаться значительным торможением биосинтеза кислых фосфолипидов в ткани печени и изменением их качественного и количественного состава. Эти изменения наряду с другими метаболическими расстройствами могут быть причиной глубоких конформационных перестроек биологических мембран гепатоцитов [10].



## ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов Ю.А., Новицкий В.В., Байков А.Н. (1994) Радионуклиды в медико-биологических исследованиях. - Томск: Изд-во Том. ун-та, 356 с.
2. Бурлакова Е.Б. (1981) Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука, 23-24.
3. Крепс Е.М. (1981) Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, . 339
4. Саатов Т.О. (1981) Укр. биохим. жур. 53. (2), 44-51.
5. Levy J., Suzuki Y., Avioli I., V. et al. (1988). Diabetologia. 31.5. 315-321.
6. Пентюк А. А. , Гуцол В. М. , Яковлева Н. В. (1987). Лаб. дело. №6. 457-459.
7. Козлов Ю.А., Сапрыкина Э.В., Байков А.Н., Новицкий В.В. (1994). Вопр. мед. химии, 40, (5), 12.-15
8. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226. 497-509.
9. Greco A.V., Mingrone G., Peruzzi E., Orlando P. (1979). Arch med. romana. 17. 4. 357-363.
10. Карагезян К. Г., Овсепян Л.М., Адонц К.Г. (1990) Вопр. мед. химии.36, (2), 10-12.

## THE STUDY OF PHOSPHOLIPID SYNTHESIS IN LIVER OF MICE WITH ALLOXAN DIABETES

E.V. SAPRYKINA, Y. A. KOZLOV , N. V. SOSNINA, A.N., NOVITSKY V.V.

Central Research Laboratory, Siberian Medical University, Tomsk

The essential decrease of the rate of turnover of phosphatidic acids (PA), polyglycerophosphates (PGP) and their lysoderivatives (LPGP), sphingomyelin (SM) and lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylethanolamine (PEA) was found in male mice of BALB/c strain with subacute alloxan diabetes (glucose concentration in the blood was not less than 14 mmol/l) during examination of phospholipid metabolism in the liver by the rate of  $^3\text{H}$ -acetate and  $^{14}\text{C}$ -palmitate incorporation into corresponding chromatographic phospholipid fractions. On the contrary, turnover of phosphatidylcholine (PC) significantly increased. The of main structural phospholipid components of hepatocyte cellular membranes -PEA and PC - were found to be decreased by 41 and 32%, respectively . LPGP and PA levels decreased to a lesser extent. The level of PGP, SM, phosphatidylinositol and LPG did not differ from the control level.

**Key words:** phospholipid synthesis, mouse liver, alloxan diabetes