

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ХАРЬКОВСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

БАБЕНКО НАТАЛИЯ АЛЕКСЕЕВНА

ГОРМОНАЛЬНЫЕ И ДИЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ
ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В ОНТОГЕНЕЗЕ

14.00.17. - нормальная физиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Х а р ь к о в - 1 9 9 2 г.



00376116 (O)

Робота виконана в научно-дослідницькому інституті оіології Харківського державного університету

Научний консультант : академик АН України, доктор біологічних наук, професор В.Н.Никитин

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор Кусень С.І.
доктор біологічних наук,
професор Бондаренко В.А.
доктор біологічних наук,
професор Чечеткин А.В.

Ведущая організація: Научно-дослідницький інститут геронтології МЗ України

Захита состоится " 12 " ноября 1992 г. в 14.00 час. на засіданні спеціалізованого ради Д.088.23.04 по захиті диссертаций на соискание ученой степени доктора біологічних наук при Харківському медичному інституті, Харків, 310022, пр.Ленина, 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Харківського медичного інститута.

Автореферат разослан " 2 " октября 1992 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
кандидат биологических наук



Актуальность проблемы. Актуальным вопросом экспериментальной и практической физиологии является выяснение закономерностей регуляции липидного обмена в онтогенезе. Возрастные изменения состава липидов в клетках различных тканей и органов тесно связаны с модификациями их функциональной активности / Hegner, 1980; Proverbio et al., 1985; Богацкая, Кульчицкий, 1986; Фролькис и др., 1987; Petkova et al., 1987; Gibson, 1987/. Нарушение процессов синтеза и деградации определенных классов липидов мембранных структур клеток в эмбриогенезе и в раннем постнатальном периоде онтогенеза приводит к изменению нормального хода развития органов и организма в целом / Yu-Yen, 1988; Sandhoff, 1988; Byers et al., 1989; Tanaka et al., 1989/. Возникновение таких патологических процессов, как атеросклероз, ожирение, онкогенез, диабет и некоторых других, развивающихся чаще всего на поздних этапах онтогенеза и в старости, коррелирует с глубокими нарушениями липидного обмена / Тацко и др., 1985; Григоров, Козловская, 1989; Mokuno et al., 1990/. В то же время механизм перестроек и нарушений в онтогенезе состава липидов и их метаболизма в различных тканях остается во многом не выяснен.

Известно, что гормональные и диетические факторы являются важными регуляторами обмена липидов, среди которых особое место занимают тиреоидные гормоны и липидные компоненты рациона. Тиреоидные гормоны, воздействуя на геном клетки, вызывают активацию процесса синтеза ряда ключевых ферментов липогенеза в печени / Oppenheim, 1985; Munz, 1988/. В то же время глубокие изменения в содержании ФЛ, ЖК, ХС и ЭХС в различных клетках, которые наблюдаются в процессе изменения функционального состояния щитовидной железы в онтогенезе и в ходе развития гипер- и гипотиреоза, не всегда удается объяснить влиянием тиреоидных гормонов на синтез белков-ферментов липидного обмена. Мало изучен вопрос гормональной регу-

Условные обозначения: ФЛ – фосфолипиды, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭА – фосфатидилэтанолламин, СФМ – сфингомиелин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ЛФЭА – лизофосфатидилэтанолламин, ФК – фосфатидная кислота, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ЖК – жирные кислоты, ТГ – триацилглицерин, МГ – моноацилглицерин, ДГ – диацилглицерин, ФМСФ – фенилметилсульфонил-фторид.

ляции метаболизма липидов в тонкой кишке, которая наряду с печенью занимает в организме центральное место в липидном обмене. Остается невыясненной физиологическая роль взаимодействия T_4 и T_3 с плазматическими мембранами клеток. Известно, однако, что липидный состав мембран во многом определяет связывание тиреоидных гормонов с рецепторами клеточной поверхности /Саатов и др., 1981, 1991/. Длинноцепочечные ненасыщенные жирные кислоты ингибируют связывание T_3 с ядерными рецепторами /Klis et al., 1989; Inoue et al., 1989; Li et al., 1990; Wiersinga et al., 1990/. Сообщалось также, что липиды отдельных классов /ФЛ, ЭХС/ играют важную роль в синтезе, секреции и транспорте тиреоидных гормонов /Field et al., 1987; Benvenista, 1989; Mori et al., 1989; Свиридов и др., 1990/. Полагают, что существует тесная взаимосвязь между метаболизмом липидов и тиреоидных гормонов в организме животных и человека.

В последние годы большое внимание уделяется вопросу гормональных влияний на метаболизм ФЛ плазматических мембран клеток /Fargnoli, 1984; Abdel Latif, 1986; Axelrod et al., 1988/. Фосфолипазы и различным продуктам деградации и превращений ФЛ/ДГ, инозитфосфатам, арахидоновой кислоте и простагландинам/ мембранных структур отводится важная роль в изменении функционального состояния клетки в ответ на гормональный сигнал. Взаимодействие различных гормонов с рецепторами плазматических мембран клеток приводит к активации фосфолипаз, которая сопровождается усиленной деградацией ФЛ, образованием вторичных посредников и формированием физиологического ответа клетки. Тиреоидные гормоны в данном плане практически не изучены. В то же время проявление целого ряда эффектов T_4 и T_3 - увеличение концентрации ионов кальция в цитозоле, транспорта аминокислот, сахаров и различных ионов через плазматическую мембрану /Tata, 1980; Hummerich, Soboll, 1989; Segal, Ingbar, 1989; Lomax et al., 1989/ происходит в первые минуты гормонального воздействия на клетку и не зависит от влияния гормонов на процессы синтеза белков. Ввиду этого изучение действия тиреоидных гормонов на различные типы фосфолипаз мембран клеток позволит выяснить механизм быстрых перестроек их липидного состава и изменения функционального состояния клеток, а также позволит установить закономерности возрастных изменений гормональной регуляции состава липидов и их различных метаболитов в печени и тонкой кишке.

Варьирование состава и калорийности рациона не только изменяет функциональное состояние щитовидной железы, но и существенным образом – состав липидов клеток и их ответ на гормональное воздействие / Burns et al., 1983; Никитин, 1984; Glatz et al., 1989; Giron et al., 1989/. В то же время конкретные механизмы такого влияния остаются не выяснены. Известно, что модификация состава липидов пищевого рациона позволяет воздействовать на определенные звенья липидного обмена и функциональную активность клеток и органов /Покровский, 1977; Kinsella et al., 1981; Марков, Атрохов, 1984; 1987; Lester, 1990/. Все это позволяет рассматривать диетические факторы в качестве потенциального регулятора клеточного обмена у животных различного возраста и тиреоидного статуса. Для решения этого вопроса представляется важным изучение возрастных особенностей влияния диет на состав липидов и их обмен в различных типах клеток в процессе развития и старения организма, а также в ходе модификации функционального состояния щитовидной железы в эксперименте.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы явилось – изучение механизма действия тиреоидных гормонов и диетических факторов на липидный обмен функционально различных субклеточных структур, клеток и органов в процессе постнатального развития и старения организма.

Для достижения этой цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести сравнительные исследования закономерностей изменения в онтогенезе состава липидов и жирных кислот клеток печени и тонкой кишки.

2. Изучить роль эндогенных фосфолипаз С, Д и сфингомиелиназ мембранных структур клеток в обмене этаноламин- и холинсодержащих фосфолипидов в процессе постнатального развития.

3. Исследовать возрастные особенности обмена жирнокислотных компонентов фосфолипидов и триацилглицеринов в изученных типах клеток, их плазматических мембранах и ядрах.

4. Выяснить возрастные особенности влияния тиреоидных гормонов и жиров диеты на состав липидов клеток печени и тонкой кишки.

5. Определить роль эндогенных фосфолипаз и ферментов, принимающих участие в ацилировании липидов различных классов, в модификациях состава фосфолипидов и жирных кислот при гормональном и диетическом воздействии на организм животных разного возраста.

6. Провести исследования различных путей регулирующего действия тиреоидных гормонов и диет на обмен жирнокислотных компонентов липидов клеток животных разного возраста.

7. Выяснить возрастные особенности модулирующего действия диетических факторов на липиды и их обмен в клетках животных различного тиреоидного статуса.

Научная новизна работы. Впервые установлены закономерности изменения в постнатальном периоде онтогенеза и, в частности, в старости состава липидов и обмена их жирнокислотных компонентов в клетках ворсинок тонкой кишки. Впервые установлено значение клеточных фосфолипаз и ферментов, принимающих участие в ацилировании фосфолипидов в изменении их уровня, содержания полиненасыщенных жирных кислот и диацилглицеринов в плазматических мембранах и ядрах клеток печени в процессе постнатального периода онтогенеза. Выявлено участие тиреоидных гормонов в регуляции формирования в клетках липидного состава мембран в ходе постнатального развития и старения организма и роль в этом процессе фосфолипаз А, С, Д и сфингомиелиназ. Установлено значение изменения в онтогенезе липидного окружения сфингомиелиназ плазматических мембран в возрастных модификациях их активности. Выявлено, что решающим звеном в гормональном действии на фосфолипазы А является активация процессов синтеза белка в клетках. Снижение под действием тиреоидных гормонов активности фосфолипазы A_2 в клетках сопровождается падением интенсивности высвобождения арахидоновой кислоты, синтеза и содержания простагландина E_2 в печени. Установлено, что тиреоидные гормоны принимают участие в регуляции в клетках печени уровня холина — предшественника донора метильных групп — бетаина. Тиреоидные гормоны оказывают активирующее действие на фосфолипазу Д и высвобождение холина из фосфатидилхолина в плазматических мембранах и угнетают этот процесс в клеточном ядре.

Впервые показано, что тиреоидные гормоны, активируя процесс обмена холинсодержащих фосфолипидов плазматических мембран клеток печени, способствуют накоплению в них ДГ и активации протеинкиназы С. Установлено, что этот фермент принимает участие в регулирующем действии тиреоидных гормонов на процесс включения линолевой кислоты в ФЛ и ТГ клеток печени. Тиреоидные гормоны не только усиливают образование ДГ из эндо- и экзогенных ФЛ в гепатоцитах, но и тормозят процесс накопления свободного сфингозина.

Установлено, что изменение состава жирового компонента рациона оказывает сильное, в различной степени выраженное у животных разного возраста, влияние на состав ФЛ, нейтральных липидов, ЖК, уровень ХС и его эфиров в клетках печени и тонкой кишки. Важная роль в действии элементов рациона на липиды субклеточных мембран

принадлежит процессам деацилирования-реацилирования липидов. Впервые изучено влияние диетических факторов на обмен ацильных компонентов ФЛ, ТГ и ЭХС ядер клеток печени животных разного возраста и роль в этом процессе эндогенных фосфолипаз и ацилтрансфераз, переносящих остатки насыщенных, моно-, ди- и тетраеновых жирных кислот. Варьирование степени насыщенности жирового компонента рациона оказывает выраженное модулирующее действие на липиды и их обмен в клетках гипотиреоидных старых животных. Применяемая диета резко снижает эффект действия тиреоидных гормонов на процесс включения линолевой кислоты в ФЛ клеток и их плазматических мембран и способствует повышению активности эндогенных сфингомиелиназ, которое сопровождается снижением уровня в мембранах сфингомиелина.

Научно-практическое значение работы. Проведенные исследования позволили установить один из механизмов регулирующего действия тиреоидных гормонов на состав липидов мембранных структур клеток - мишеней. Так, установлено, что в изменении в онтогенезе, в процессе модификации функционального состояния щитовидной железы, уровня холинсодержащих фосфолипидов, полиненасыщенных жирных кислот и диацилглицеринов, важная роль принадлежит эндогенным фосфолипазам и трансферазам различных типов. Тиреоидные гормоны, регулируя активность ключевых ферментов обмена фосфолипидов в печени, оказывают модифицирующее действие на образование их биологически активных метаболитов - диацилглицеринов, холина, арахидоновой и фосфатидной кислот и, таким образом, участвуют в регуляции многообразных клеточных функций, вызывают активацию протеинкиназы С, элиминацию полиненасыщенных жирных кислот за счет их усиленного включения в липиды, снижение синтеза и содержания простагландинов в клетке. Важным представляется то, что ряд эффектов тиреоидных гормонов на обмен структурных компонентов фосфолипидов и триацилглицеринов связан с их непосредственным действием на мембранные структуры клеток. Полученные данные о возрастных особенностях действия тиреоидных гормонов на липиды и их обмен в функционально различных структурах клеток /ядерных и плазматических мембранах/ тканей, занимающих центральное место в метаболизме липидов, на фоне различного тиреоидного состояния животных разного возраста представляет значительный интерес для физиологии, поскольку позволяют глубже понять механизм действия тиреоидных гормонов на липидный метаболизм, множественность эффектов их действия и их физиологи-

ческий смысл.

Важным выводом работы является то, что один из наиболее физиологических приемов воздействия на организм животных разного возраста — диетический, не только оказывает непосредственное влияние на структурно-функциональные свойства клетки и на метаболизм тканей и организма, но и воздействует на определенные звенья гормональной регуляции клеточного обмена, что имеет большое практическое значение. Представляется перспективным использование в эндокринологии и гериатрии эффекта совместного действия гормональных препаратов и диетических воздействий, а также элементов рациона с целью коррекции липидного обмена, нарушенного в ходе развития патологического процесса.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены и доложены на XII /Львов, 1986/ и XIII /Харьков, 1990/ съездах Украинского физиологического общества, IX /Ленинград, 1986/ и X /Ленинград, 1990/ Всесоюзных Совещаниях по эволюционной физиологии, на IX /Черноголовка, 1987/ и X /Тродно, 1990/ Всесоюзных симпозиумах "Структура и функции клеточного ядра", на Всесоюзном симпозиуме "Нейрогуморальные механизмы старения" /Киев, 1986/, симпозиуме "Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза" /Харьков, 1987/, на XV съезде Всесоюзного физиологического общества /Кишинев, 1987/, на V Всесоюзной межвузовской конференции "Биология клетки" /Тбилиси, 1987/, на I съезде геронтологов и гериатров Украины /Днепропетровск, 1988/, V Всесоюзном съезде геронтологов и гериатров /Тбилиси, 1988/, на XI Международном рабочем совещании по клеточному ядру /Суздаль, 1989/, на Всесоюзном симпозиуме "Реконструкция, стабилизация и репарация биологических мембран" /Благовещенск, 1989/, Всесоюзном симпозиуме "Биохимия рецепторных систем" /Таллинн, 1990/, на 9 международной школе Европейского общества мембранной науки и технологии /Звенигород, 1991/, на Всесоюзной конференции "Продолжительность жизни: механизмы, прогнозы, пути увеличения" /Киев, 1991/.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 31 работе, в том числе в 14 статьях.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Текст диссертации изложен на 230 страницах машинописного текста, иллюстрирован 72 таблицами и 28 рисунками. Библиография включает 507 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. Эксперименты проводили на белых крысах-самцах линии Вистар I-, 3-, 12- и 24-месячного возраста. В опытах использовали нормальных животных; крыс после внутрибрюшинного введения им в течение 7 дней L-тироксина /200 мкг на 100 г массы/; крыс после трехкратного в течение недели введения L-тироксина /120 мкг на 100 г массы/; животных после внутрибрюшинного введения им в течение 16 дней мерказолила /1-метил-2-меркаптоимидазола/ в дозе 2 мг на 100 г массы; гипотиреоидных крыс, которым за 48 часов до забоя вводили L-тироксина в дозе 500 мкг или 250 мкг на 100 г массы. В отдельных случаях L-тироксин /250 мкг/ 100 г/ вводили гипотиреоидным животным совместно с циклогексимидом /50 мкг/100 г/.

Для решения вопроса регуляции липидного обмена с помощью жирового компонента рациона эксперименты проводили на крысах 3- и 24-месячного возраста пяти групп. I, II и III группы составляли животные, получившие в течение 2 недель натуральные корма; жировой компонент диеты составлял 14%, 32% и 32% калорийности соответственно. Рацион II группы был обогащен ненасыщенными липидами подсолнечного масла, III группы - насыщенными липидами говяжьего жира. В отдельных экспериментах животным II экспериментальной группы вводили мерказолил по схеме, описанной выше. IV и V группы составляли животные, получавшие в течение 8 недель, начиная с 1- и 22-месячного возраста, рацион с содержанием по калорийности белка /20% казеина/, углеводов /50% крахмала/ и жира /30%/ /Burns et al., 1983/. При этом жировой компонент контрольных животных /IV группы/ состоял из смеси подсолнечного масла и говяжьего жира, подопытных крыс /V группы/ - исключительно из подсолнечного масла. Кроме этого, обязательным компонентом рациона являлись минеральные вещества и витамины. Пищу и воду животные получали *ad libitum*. Забой животных проводили в 9-10 час.

Гепатоциты из печени животных выделяли по методу Канаевой и соавт. /1975/. Клетки ворсинок тонкой кишки - по Hoffman, Kuksis /1978/. Ядра из клеток печени выделяли по Blobel, Potter /1966/, микросомы - по Kamath, Narayan /1972/, плазматические мембраны - по методу Neville /1960/. Экстракцию липидов из клеток и субклеточных фракций проводили по методу Folch et al., /1957/ и Bligh, Dyer /1959/. Разделение липидов на отдельные фракции проводили с помощью методов одномерной и двумерной тонкослойной

хроматографии на силикагеле. Для этой цели использовали силикагель Woelm /W.Germany/ и коммерческие пластины /TLC-plates, "Sigma", США; Silufol, "Sklavny Kavalier", СССР/. Разделение общих липидов проводили в системе: гексан, диэтиловый эфир, уксусная кислота /73:25:2, v/v /; фосфолипидов в системах: I - хлороформ, метанол, 18% NH_4OH /65:25:5, v/v / и II - хлороформ, ацетон, метанол, уксусная кислота, вода /60:80:20:20:10, v/v /. Для выделения свободного сфингозина экстракты липидов предварительно очищали от ФЛ и нейтральных липидов /Merrill et al., /1983/. Хроматографическое фракционирование сфингозиновых оснований проводили на силикагеле в системе : хлороформ, метанол, 2N NH_4OH /40:10:1, v/v /. Идентификацию липидов проводили с помощью свидетелей /"Sigma", США/ и цветных реакций на отдельные ФЛ. Количество липидов во фракциях определяли по March, Weinstein /1966/ и с помощью сканирования предварительно окрашенных Coomassie Brilliant Blue / /"Sigma", США/ хроматограмм/Nakamura, Nanda 1984/ на денситометре Chromoscan 3 фирмы Joyce-Loeble /Англия/.

Анализ жирных кислот липидов проводили методом газо-жидкостной хроматографии на хроматографе Pye /Англия/. Согласно рекомендациям Кузнецова, Семеновой /1979/ получали метиловые эфиры жирных кислот. Простагландин E_2 в сыворотке крови и печени определяли с помощью набора [^3H] Prostaglandin E Radioimmunoassay Kit / Cambridge, Massachusetts , США/. T_4 и T_3 в сыворотке крови - с помощью наборов радио- T_4 -ПГ и радио- T_3 -ПГ. Белок в гомогенатах тканей и мембранах определяли по Lowry et al.,/1951/. Протеинкиназу С из цитозоля и мембран клеток печени выделяли и очищали с помощью ионнообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе /Сидоркина и соавт., 1988; Kato, Kishita, 1989/. Активность протеинкиназы С определяли по переносу ^{32}P с [γ - ^{32}P] АТФ /БЮ "Изотоп"/ на гистон H1. Гликозо-6-фосфатазу и 5-нуклеотидазу в гомогенатах и плазматических мембранах клеток определяли по методу Widnell, Unkeless /1968/ и De Duve et al. /1955/.

Активность фосфолипаз A_1 и A_2 определяли по методу Nachbaur /1972/. В качестве субстрата использовали I-ацил, 2- [^{14}C] арахидонилфосфатидилэтанолламин/ "Amersham", Англия/. Об активности ферментов судили по образованию [^{14}C] ЛФЭА и [^{14}C] арахидоновой кислоты. Изучение включения [^{14}C] пальмитиновой, [^{14}C] олеиновой, [^{14}C] линолевой и [^3H] арахидоновой кислот / "Amer-

sham", /Англия/ в липиды - по методу Baker, Chang /1983/. Об активности триацилглицеринлипаз клеток судили по образованию в процессе инкубации $[^3\text{H}]$ ДГ и $[^3\text{H}]$ олеиновой кислоты из $[^3\text{H}]$ триолеата / "Amersham", Англия/ /Брокерхоф, Дженсен, 1978/. Активность сфингомиелиназ определяли согласно методу Hostetler, Yazaki /1979/. В качестве субстрата использовали $[^{14}\text{C}$ -метил] сфингомиелин /"Amersham", Англия/. Активность фосфолипаз С и Д определяли в основном в условиях, описанных Kolesnick, Paley /1987/. Для определения водорастворимых продуктов деградации ФЛ использовали в качестве субстрата $[^{14}\text{C}$ -метил] фосфатидилхолин / "Amersham", Англия/. Для изучения образования ДГ и ФК использовали I-ацил, 2- $[^{14}\text{C}]$ арахидонилфосфатидилхолин и I-ацил, 2- $[^{14}\text{C}]$ арахидонилфосфатидилэтанолламин / "Amersham", Англия/. Для изучения образования сфингозина в процессе активации сфингомиелиназ и под действием тиреоидных гормонов СФМ предварительно метили в условиях *in vivo* с помощью $[^{14}\text{C}]$ ацетата натрия /отечественного производства/. Синтез сфингозина *in vitro* изучали по методу Messmer et al., /1988/. В качестве предшественника использовали $[^{14}\text{C}]$ пальмитойл-КоА /"Amersham", Англия/. Для модификации состава липидов и функциональной активности клеток в условиях *in vitro* использовали липидпереносящие белки и липосомы, содержащие ФХ, СФМ, ФИ, ДГ, сфингозин, арахидоновую кислоту, приготовленные согласно рекомендациям Дятловицкой и соавт. /1982/ и Merrill et al., /1989/, а также экзогенные фосфолипазу С *Bacillus cereus*, сфингомиелиназу *Staphylococcus aureus* /"Sigma", США/ и фторбол-I2-миристан-I3-ацетат / "Sigma", США/. Результаты опытов подвергали вариационно-статистическому анализу.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Возрастные особенности состава липидов и их обмена в клетках функционально различных тканей и субклеточных структурах

Липиды клеток тонкой кишки и печени

Сравнительное изучение состава липидов печени и тонкой кишки животных I-24 месячного возраста позволило выявить ряд особенностей и закономерностей его изменения в онтогенезе. Так, если в печени, отдельных ее клетках и их плазматических мембранах глубокие изменения в постнатальном периоде онтогенеза наряду с содержанием ХС, ЭХС и ЖК претерпевает содержание ФЛ, то в тонкой кишке - пре-

имущественно нейтральных липидов. Уровень общих и индивидуальных ФЛ в клетках ворсинок остается неизменным на протяжении всего изученного периода развития и старения организма. Снижение к старости /24-месячному возрасту/ в гепатоцитах и плазматических мембранах клеток печени уровня ФЛ происходит параллельно увеличению содержания ЭХС и, в меньшей степени, ЖК. В то же время в клеточном ядре и плазматических мембранах в старости резко увеличивается содержание ДГ и МГ. В клетках ворсинок тонкой кишки снижение содержания ТГ в период между I и 3 месяцами постнатального развития происходит параллельно увеличению содержания продуктов их деградации: ЖК, МГ и ДГ. В дальнейшем онтогенезе содержание нейтральных липидов и ЭХС остается неизменным, в то время как ЭХС - увеличивается, а ЖК - снижается к старости. Более однонаправленно изменяется в онтогенезе спектр индивидуальных жирных кислот в изученных типах клеток. Так, содержание полиеновых ацилов падает, а моноеновых увеличивается как в липидах печени, так и в липидах тонкой кишки к 24-месячному возрасту. Общее содержание ненасыщенных жирных кислот в липидах клеток остается неизменным в изученный период онтогенеза.

По многочисленным наблюдениям изменение в онтогенезе в мембранных структурах клеток различных типов уровня ФЛ, ЭХС и полиненасыщенных жирных кислот - одна из причин модификации активности мембраносвязанных ферментов /Negner, 1980; Proverbio et al., 1985; Богацкая, Кульчицкий, 1986; Petkova et al., 1987/, интенсивности транспорта различных ионов и метаболитов в клетку и изменения ее ответа на гормональное воздействие /Moscona-Amir et al., 1986; Gibson, 1987; Frolkis et al., 1987; Гацко, 1988/. Ввиду этого становится очевидным, что наблюдаемые в настоящих исследованиях изменения в онтогенезе в клетках, их плазматических мембранах и ядрах содержания липидов отдельных классов - отражение глубоких возрастных изменений их структурно-функциональных свойств. Выяснение причин колебаний уровня липидов в изученных клетках в процессе развития и старения организма позволит выявить важнейшие пути направленного воздействия на липидный обмен с целью его коррекции.

Обмен жирнокислотных компонентов фосфолипидов и триацилглицеринов

Важная роль в формировании жирнокислотного спектра ФЛ, в изменении в клетках уровня ФЛ, ТГ, ДГ, МГ, ЖК и ЭХС принадлежит липа-

зам и ацилтрансферазам различных типов. В то же время, вклад процесса деацилирования-реацилирования в изменение в онтогенезе состава липидов мембранных структур клеток изучен недостаточно. В настоящей работе изучали возрастные особенности процесса деградации ФЛ и ТГ клеток при участии эндогенных липолитических ферментов и их ресинтеза в ходе реакций ацилирования.

Установлено, что интенсивность обмена жирнокислотных остатков ФЛ в клетках печени повышается в 3-месячному возрасту и снижается к старости /рис.1/. Как в плазматических мембранах, так и в клеточном ядре в процессе старения организма /к 24 месяцам/ снижается активность фосфолипазы A_2 . В то же время активность фосфолипа-

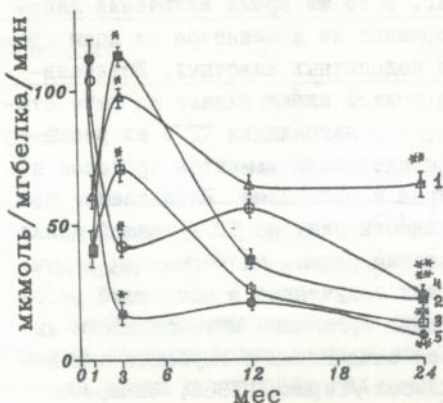


Рис.1. Возрастные особенности интенсивности деацилирования-реацилирования липидов в печени крыс. 1 - активность фосфолипазы A_2 ; 2 - включение в ФЛ пальмитиновой, 3 - линолевой кислот /мкмоль · 10⁻¹ · мг белка⁻¹ · мин⁻¹/; 4 - включение в ТГ - пальмитиновой, 5 - линолевой кислот /мкмоль · мг белка⁻¹ · мин⁻¹/. * - $P_{1-3мес.} < 0,001$; ** - $P_{3-24мес.} < 0,05$

зы A_1 в ядрах клеток печени 24-месячных животных гораздо выше, чем у молодых крыс. Снижение в онтогенезе в клетках активности фосфолипазы A_2 и интенсивности включения полиненасыщенных жирных кислот в состав ФЛ - важная причина падения к старости уровня арахидоновой кислоты в липидах печени. Повышение активности в ядрах клеток фосфолипазы A_1 приводит к увеличению в ядерной оболочке концентрации лизофосфолипидов по мере старения организма /Габенко, 1985/.

Иной характер носит обмен насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот ТГ клеток печени и ворсинок тонкой кишки. Интенсивность включения пальмитиновой и линолевой кислот в ТГ печени резко падает в период между 1 и 3 месяцами развития, на этом уровне сохраняется вплоть до 12-месячного возраста и снижается к старости/рис.1/. Падение уровня ацилирования ТГ в печени происходит параллельно повышению интенсивности их деградации при участии триацилглицеринлипазы в клетках 24-месячных крыс. В то же время в клеточном ядре

активность эндогенной липазы резко снижается к старости: активность фермента составляет $107 \pm 2,40$ и $22,6 \pm 0,01$ нмоль ДГ·мг белка⁻¹ /за 20 мин/ в ядрах 3 и 24-месячных животных соответственно. Понижается в ядрах в онтогенезе интенсивность синтеза ТГ из пальмитиновой, олеиновой, линолевой и арахидоновой кислот. В целом, по мере старения организма увеличивается доля включения жирных кислот в состав ФЛ клеточного ядра за счет снижения ацилирования нейтральных липидов.

Изучение процессов синтеза и деградации липидов в клетках ворсинок тонкой кишки позволило установить, что снижение к 3-месячному возрасту интенсивности включения пальмитиновой кислоты в состав эндогенных ТГ совпадает по времени со снижением уровня этих липидов и повышением — ЖК, ДГ и МГ. В то же время включение линолевой кислоты в ФЛ и ТГ клеток ворсинок не изменяется на всем протяжении постнатального онтогенеза подопытных животных. Интенсивность деградации экзогенного ТГ в тонкой кишке падает по мере старения организма. Известно, однако, что деградация ТГ и их ресинтез в клетках ворсинок является определяющим моментом процесса переваривания и усвоения пищевых жиров в организме. Наблюдаемые изменения состава липидов и интенсивности синтеза ТГ в тонкой кишке молодых животных — отражение изменения режима их кормления в данный возрастной период. В то же время полученные в настоящей работе данные о снижении по мере старения организма интенсивности липолиза ТГ в тонкой кишке, наряду со сведениями о глубоких изменениях в старости ультраструктуры клеток /Терман, 1988; Thompson et al., 1990/, синтеза и превращений ХС /Uchida et al., 1987/, переваривания и всасывания углеводов /Уголев и др., 1986/ свидетельствуют о нарушении его функциональной активности в старости.

Фосфолипазы С и Д клеток печени

В последнее время интерес исследователей привлекают клеточные фосфолипазы С и Д. В большей степени это определяется тем, что данные ферменты являются важным звеном в цепи передачи сигналов разной природы внутрь клетки /Kolesnick, Paley, 1987; Kiss, Anderson, 1990; Billah, Anthes, 1990/. Образующиеся при этом в процессе активации фосфолипаз ДГ и ФК выполняют роль вторичных посредников. Эти липиды занимают центральное место в синтезе ФЛ и ТГ и, кроме того, являются источником свободной арахидоновой кислоты в клетках. Следует отметить, однако, что наиболее изучен процесс образования ДГ в ходе активации полифосфоинозитидспецифич-

ной фосфолипазы С. Роль фосфолипаз, вызывающих деградацию ФХ и ФЭА в клетках печени в постнатальном периоде онтогенеза остается невыясненной.

В настоящей работе установлено, что как в целых клетках, так и в клеточных ядрах процесс деградации ФЛ при участии фосфолипаз С и Д резко увеличивается к старости /табл. I/.

Таблица I

Возрастные особенности образования ДГ и ФК из $[^{14}\text{C}]\text{ФХ}$ и $[^{14}\text{C}]\text{ФЭА}$ в клетках печени /нмоль·мг белка $^{-1}$ ·мин $^{-1}$ /

Объект изучения!	Продукт ! деградации ФЛ !	Возраст крыс, месяцы	
		3	24
Гепатоцит	ДГ ^а	0,08 ± 0,01	1,54 ± 0,31 ^В
Ядро	ДГ ^а	0,38 ± 0,00	1,08 ± 0,14 ^В
	ДГ ^б	0,28 ± 0,01	0,46 ± 0,01 ^В
	ФК ^б	0,18 ± 0,02	2,42 ± 0,56 ^В

^а - источник ДГ - I ацил, 2- $[^{14}\text{C}]$ арахидонилфосфатидилэтанолламин
^б - I-ацил, 2- $[^{14}\text{C}]$ линолеилфосфатидилхолин, ^В - P_{3-24} мес < 0,05.

В плазматических мембранах молодых /3-месячных/ животных практически не происходит деградация ФЛ при участии фосфолипаз С и Д, в то же время в старости /24 месяца/ за 15 минут инкубации наблюдается деградация 20% экзогенного $[^{14}\text{C}]\text{ФХ}$ и образование $12,6 \pm 1,6$ нмоль·мг белка $^{-1}$ $[^{14}\text{C}]$ фосфорилхолина. В клеточных ядрах к 24-месячному возрасту также происходит резкое повышение высвобождения в среду инкубации меченых $[^{14}\text{C}]$ холина и фосфорилхолина из $[^{14}\text{C}$ -метил] ФХ. Активация в интактных клетках и их отдельных мембранных структурах фосфолипаз С, вызывающих деградацию ФХ и ФЭА и высвобождение ДГ, к 24 месяцу является одной из причин повышения к старости концентрации ДГ в плазматических и ядерных мембранах клеток. Не исключено, что превалирование в клетках печени 24-месячных животных по сравнению с 3-месячными процесса деградации ТГ над процессом их ресинтеза также вносит определенный вклад в изменение в онтогенезе уровня ДГ в мембранах клеток.

Сфингомиелиназы клеток печени и их плазматических мембран

Установлено, что инкубация клеток печени и их плазматических мембран в среде, содержащей $[^{14}\text{C}$ -метил] СФМ и ионы магния /рН 7,1/,

приводит к деградации фосфолипида, которая сопровождается высвобождением фосфорилхолина и образованием ФХ /табл.2/. Этот процесс более интенсивно протекает в клетках печени молодых половозрелых животных по сравнению с крысами других изучавшихся возрастных групп.

Таблица 2

Возрастные особенности обмена $[^{14}\text{C}]$ СФМ в плазматических мембранах клеток печени крыс /нмоль·мг белка $^{-1}$ ·мин $^{-1}$ /

Субстрат и продукты его превращений	Возраст крыс, месяцы	
	3	24
СФМ ^а	87,0 ± 9,00	11,8 ± 0,11 ^В
ФХ ^б	17,6 ± 0,85	0,084 ± 0,012 ^В
Фосфорилхолин ^б	6,80 ± 0,19	3,02 ± 0,27 ^В

^а - количество гидролизованного СФМ; ^б - образовавшиеся продукты обмена СФМ; ^В - P₃₋₂₄ мес. < 0,001

Установлено также, что как в процессе активации эндогенных сфингомиелиназ плазматических мембран, так и при действии на клетки печени сфингомиелиназы *Staphylococcus aureus* снижение уровня СФМ сопровождается накоплением продукта его глубокой деградации - сфингозина. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, выполненных на клетках разных типов /Merrill et al., 1990, Алесенко и др., 1990/.

Инкубация нативных гепатоцитов в присутствии ионов магния /рН 7,1/ сопровождается интенсивной деградацией эндогенного СФМ. В течение 20 мин. происходит снижение уровня СФМ на 44,6% и 27,7% в клетках 3 и 24-месячных животных соответственно. Таким образом, в старости не только снижается интенсивность деградации экзогенного липида, но и СФМ клеток печени. Снижение к 24-месячному возрасту активности сфингомиелиназ в печени коррелирует с повышением в гепатоцитах и плазматических мембранах относительного содержания СФМ. Прединкубация плазматических мембран с липидпереносящими белками и липосомами, содержащими ФХ /выделенный из печени/ или арахидоновую кислоту, приводит к двукратному повышению активности сфингомиелиназ. В то же время в настоящей работе установлено, что к старости резко снижается содержание ФХ в плазматических мембра-

нах клеток и уровень в липидах печени арахидоновой кислоты. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в изменении в онтогенезе активности сфингомиелиназ плазматических мембран важную роль играет липидное окружение фермента.

II. Влияние тиреоидных гормонов на липиды и их обмен в печени и тонкой кишке крыс различного возраста

Учитывая то, что на протяжении всего периода индивидуального развития и старения организма происходят существенные изменения функциональной активности щитовидной железы, обмена и рецепции тиреоидных гормонов в клетках тканей-мишеней /Никитин, 1979; Фролькис, 1984; Livingston et al., 1987; Parle et al., 1990; De Nayer et al., 1991/ представляло значительный интерес выяснить взаимосвязь между тиреоидным статусом подопытных животных различного возраста и состоянием их липидного обмена. Для этой цели проведены исследования состава липидов и обмена их отдельных структурных компонентов в клетках животных 1-24-месячного возраста на фоне развития экспериментального гипотиреоза и действия экзогенных T_4 и T_3 .

Полученные данные свидетельствуют о глубоких изменениях липидного обмена в клетках печени и тонкой кишки гипо- и гипертиреоидных животных изучавшихся возрастных групп. Несмотря на общую тенденцию к снижению в ходе эксперимента уровня ФЛ и повышения - ЭХС в клетках, установлены существенные различия действия гипотиреоза и тиреоидных гормонов на липиды целой печени, плазматических мембран и клеточных ядер. Развитие гипотиреоза сопровождается повышением, а гипертиреоза - снижением содержания общих ФЛ в плазматических мембранах клеток как молодых, так и старых животных. Гипертиреоз приводит к падению уровня ФЛ в печени и ядрах клеток 3-месячных животных. При этом наблюдается существенный рост концентрации ЭХС в клетках печени и ЖК в плазматических мембранах. При гипотиреозе снижается содержание ФЛ в печени животных 1-24-месячного возраста и полностью сглаживаются возрастные различия между ними по данному показателю. В клетках ворсинок тонкой кишки на фоне снижения у гипотиреоидных животных /1-24-месячного возраста/ содержания ФЛ происходит резкое падение уровня МГ и ДГ. Учитывая то, что эндогенные фосфолипазы, липазы и ацилтрансферазы играют важную роль в изменениях в онтогенезе уровня различных классов липидов в клетках и их отдельных мембранных структурах, в дальнейшем исследовании

АН УРСР

проведено изучение влияния тиреоидных гормонов на обмен структурных компонентов ФЛ и ТГ печени и тонкой кишки.

Тиреоидные гормоны и обмен насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот липидов клеток

В опытах на гипертиреоидных, гипотиреоидных животных, а также гипотиреоидных крысах, которым вводили T_4 , установлено, что фосфолипазы A_1 и A_2 гепатоцитов и ядер клеток печени находятся под контролем тиреоидных гормонов. Развитие гипотиреоза сопровождается резким повышением активности фосфолипаз A ядер, а введение T_4 гипотиреоидным крысам полностью угнетает процесс высвобождения арахидоновой кислоты и образования ЛФФА /табл.3/.

Таблица 3

Влияние тиреоидных гормонов на активность фосфолипаз A_1 и A_2 ядер клеток печени крыс 3-месячного возраста /нмоль·мг белка⁻¹·мин⁻¹/

Фосфолипаза	! Контроль	! Гипотиреоз	! Гипотиреоз + T_4^a
A_1	$0,110 \pm 0,039$	$0,472 \pm 0,026^b$	0
A_2	$0,167 \pm 0,036$	$0,662 \pm 0,161^b$	0
A_1 / A_2	0,65	0,71	-

$a - T_4$ вводили /500 мкг/100 г массы/ за 48 часов до забоя животных;

$b - P_{\text{контроль-гипотиреоз}} < 0,001$

Тироксин не оказывает влияния на фосфолипазы $A_1 + A_2$ и A_2 плазматических мембран клеток печени. Следует отметить, что тиреоидные гормоны не влияют на активность фосфолипаз в клетках старых 24-месячных крыс. В то же время циклогексими́д активизирует ингибированные под действием T_4 фосфолипазы гепатоцитов 3-месячных животных.

Ингибирующее действие на активность фосфолипазы A_2 ядер клеток печени оказывает также ФМСФ в концентрации /1 мМ/, вызывающей ингибирование сериновых протеиназ /активность фермента в контроле и опыте составляет соответственно $3,54 \pm 0,96$ и $0,79 \pm 0,04$ нмоль·мг белка⁻¹ за 20 мин; $P < 0,001$ /. Установлено, что введение гипотиреоидным крысам T_3 увеличивает в 13 раз концентрацию в цитоплаз-

ме клеток мРНК, кодирующей белок, принадлежащий к суперсемейству ингибиторов сериновых протеиназ / Tesse et al., 1986/. Сообщалось также о возможном участии сериновых протеиназ в активации фосфолипазы A_2 тромбоцитов / Lapetina, 1984/. Ввиду этого, а также учитывая полученные в настоящей работе данные, можно полагать, что ингибирующее действие тиреоидных гормонов на активность фосфолипаз типа А связано с подавлением под действием гормона процесса частичного протеолитического расщепления фермента, лежащего, по-видимому, в основе его активации. Не исключено, что тиреоидные гормоны, подобно стероидным / Errasfa et al., 1989; Mansbach, 1990/, усиливают в клетках также синтез белка-ингибитора фосфолипазы A_2 .

Иной характер носит действие тиреоидных гормонов на процесс включения жирных кислот в состав ФЛ и ТГ клеток печени. Развитие гипертиреоза /при введении животным в течение 7 дней T_4 в дозе 200 мкг/100 г массы/ однако сопровождается угнетением процесса включения пальмитиновой кислоты в ФЛ и ТГ, а линолевой кислоты в ТГ целой печени молодых животных в результате их усиленного окисления в данных условиях /Chalk et al., 1983; Sockor et al., 1988/. В то же время в старости увеличение под действием гормонов интенсивности включения ЖК в ФЛ, по-видимому, является результатом переключения их обмена с пути окисления на путь эстерификации. По данным Пашковой и Малеева /1979/, индукция тиреоидными гормонами окисления экзогенных и эндогенных жирных кислот резко снижена, а в некоторых случаях в печени крыс 24-месячного возраста отсутствует вообще. В то же время тиреоидные гормоны независимо от применяемой в настоящей работе дозы, в условиях не только *in vitro*, но и *in vivo* вызывают интенсификацию процесса включения линолевой кислоты в ФЛ клеток печени и их плазматических мембран, а в дозе 120 мкг на 100 г массы в течение 3 дней увеличивает включение ЖК в ТГ.

Снижение под действием тиреоидных гормонов активности фосфолипазы A_2 , которое сопровождается падением интенсивности высвобождения свободной арахидоновой кислоты, с одной стороны, и усиленная элиминация из среды полиненасыщенных жирных кислот в ходе повышения процесса их включения в состав ФЛ, с другой, — одна из причин снижения под действием T_4 скорости синтеза простагландина E_2 в клетках и его уровня в печени. Так, содержание простагландина в печени 3-месячных крыс составляет $4,17 \pm 0,67$ и $2,18 \pm 0,50$ нг·г⁻¹ / $P < 0,05$ / соответственно в контроле и при введении животным за 48 часов до забоя T_4 .

Следует отметить, что введение тироксина животным вызывает повышение содержания в клетках ворсинок тонкой кишки ЛФХ при одновременном снижении уровня ФХ. Учитывая эти данные, а также многочисленные доказательства наличия фосфолипаз A_1 и A_2 в мембранах клеток ворсин / *Shakir et al.*, 1982; *Gassama-Diagne*, 1989/, данные о том, что ФХ является эндогенным субстратом этих ферментов / *Gassama-Diagne*, 1989/, можно полагать, что под действием тиреоидных гормонов в клетках тонкой кишки происходит активация фосфолипаз типа А. Функциональное значение фосфолипаз А клеток тонкой кишки остается окончательно не выясненным. В то же время известно, что ЛФХ – продукт деградации ФХ под действием панкреатической фосфолипазы благодаря своим детергентным свойствам способствует эмульгированию липидов пищи. Кроме того, установлено, что ЛФХ существенно увеличивает проницаемость клеток ворсинок подвздошной кишки для различных веществ / *Robin et al.*, 1981/. Показано также, что под действием тиреоидных гормонов морфологические изменения клеток ворсинок и мышечного слоя тонкой кишки сопровождаются увеличением ее двигательной, секреторной и всасывающей способности / *Рачев, Ещенко*, 1975; *Rao et al.*, 1982; *Folter et al.*, 1989/. Модификация уровня циркулирующих в организме тиреоидных гормонов является причиной изменения интенсивности поступления липидов, метаболизма ХС и синтеза аполипопротеинов в кишечнике / *Rao et al.*, 1982; *Wilcox et al.*, 1988/. Не исключено, что активация под действием тиреоидных гормонов активности фосфолипаз А и образования в тонкой кишке лизофосфолипидов является одним из факторов повышения ее функциональной активности в данных условиях.

Проведенные в настоящей работе исследования действия тиреоидных гормонов на процесс деградации ТГ и их ресинтеза в клетках ворсинок животных различного возраста также позволили установить глубокие изменения основных функций тонкой кишки в ходе эксперимента.

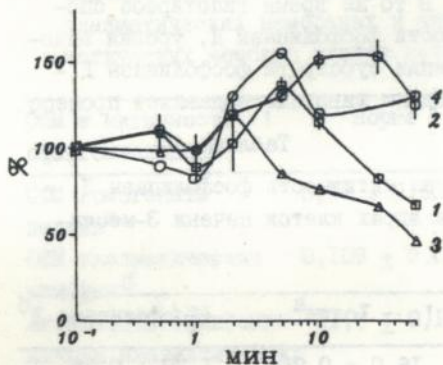
Развитие гипотиреоза угнетает как деградацию меченого ТГ, так и его ресинтез в тонкой кишке животных 3- и 24-месячного возраста. Введение тироксина не изменяет у молодых животных интенсивности липолиза ТГ и их ресинтеза в клетках 24-месячных крыс. В то же время гипотиреоз снижает уровень включения пальмитиновой и линолевой кислоты в ФЛ и ТГ клеток 3-месячных животных. В целом проведенные исследования свидетельствуют о глубоком влиянии тиреоидных гормонов на обмен липидов в клетках тонкой кишки крыс различного возраста. Развитие гипертиреоза приводит к наиболее глубоким изменениям спектра липидов и их обмена в клетках ворсинок молодых крыс,

в то время как подавление функции щитовидной железы - на липиды клеток стареющих и старых животных. Гипотиреоз нивелирует возрастные различия ресинтеза ТГ /в присутствии пальмитиновой кислоты/ в клетках тонкой кишки крыс I-24-месячного возраста, что свидетельствует о важной роли тиреоидных гормонов в изменении в онтогенезе этого процесса.

Гормональная регуляция активности фосфолипаз С и Д

Проведенными в настоящей работе исследованиями установлено, что изменение функционального состояния щитовидной железы в онтогенезе и в ходе развития экспериментального гипер- и гипотиреоза сопровождается глубокими изменениями уровня ФЛ и ДГ в плазматических мембранах и ядрах. Показано также, что в повышении уровня ДГ в изученных мембранных структурах в старости важная роль принадлежит эндогенным фосфолипазам С. Ввиду этого целью следующей серии экспериментов явилось изучение влияния тиреоидных гормонов на образование в клетках ДГ и роль в этом процессе эндогенных фосфолипаз. Установлено, что T_3 при действии в условиях *in vitro* на клетки печени молодых животных вызывает накопление в них ФК и холина, что свидетельствует об активации в данных условиях фосфолипазы Д /рис.2/.

Рис.2. Влияние T_3 / $1 \cdot 10^{-8} M$ / на процесс высвобождения из ФХ в гепатоцитах 3-месячных крыс: ДГ /1/, холина /2/, фосфорилхолина /3/, ФК /4/ /% от контроля/.



Уровень ЛФХ, ТГ и ЖК не изменяется, а фосфорилхолина несколько снижается в среде инкубации клеток под действием на них гормона. Влияние T_3 на активность фосфолипазы Д носит дозозависимый харак-

тер. Инкубация плазматических мембран клеток печени молодых животных с T_4 сопровождается интенсивной деградацией ФХ, приводящей к накоплению холина. Активация фосфолипазы Д в клетках печени наблюдается при введении T_4 гипотиреодным крысам 3-месячного возраста. В то же время при действии тиреоидных гормонов на клетки печени и их плазматические мембраны старых 24-месячных крыс не происходит образования ДГ и активации фосфолипазы Д.

Учитывая тот факт, что накоплению ДГ в клетках печени под действием гормона предшествует повышение концентрации ФК /рис.2/, можно полагать, что ДГ образуется в процессе дефосфорилирования ФК при участии фосфатидатфосфогидролазы /Martin et al., 1987; Lamb et al., 1987/. Кратковременное повышение в мембранах концентрации ДГ в ходе гормонального воздействия на клетку может служить импульсом в процессе активации протеинкиназы С. Есть сведения о том, что и сама ФК является регулятором протеинкиназной активности /Ando, Yas et al., 1989/. Кроме того, благодаря своим ионоформным свойствам этот липид способствует изменению интенсивности поступления кальция в клетку /Onsako et al., 1981; McGhee et al., 1990/.

Другое действие оказывают тиреоидные гормоны на процесс образования ДГ и ФК в ядрах клеток печени крыс. Гипотиреоз не влияет, а введение T_4 /500 мкг/100 г массы/ подавляет образование ДГ в ядрах из экзогенного меченого ФЭА. В то же время гипотиреоз способствует повышению в ядрах активности фосфолипазы Д, уровня эндогенного холина и снижению концентрации субстрата фосфолипазы Д - ФХ /табл.4/. Введение T_4 гипотиреодным животным подавляет процесс

Таблица 4

Влияние гипотиреоза и тироксина на активность фосфолипазы Д, уровень эндогенных холина и ФХ в ядрах клеток печени 3-месячных крыс

Животные	!	ФХ ^а	!	Холин ^а	! Фосфолипаза Д ^б
Нормальные		89,9 ± 5,88		16,0 ± 0,95	1,20 ± 0,25
Гипотиреодные		43,2 ± 1,56 ^в		23,4 ± 1,80 ^в	4,60 ± 0,10 ^в
Гипотиреодные + T_4		107 ± 12,2		9,83 ± 0,18	3,04 ± 0,29

^а - нмоль·мг белка⁻¹; ^б - нмоль·мг белка⁻¹·мин⁻¹; ^в - $P_{\text{норма-гипотиреоз}} < 0,05$

высвобождения холина, образования ФК и нормализует уровень эндогенных ФХ и холина в клеточном ядре. Учитывая эти данные, а также то, что у нормальных 24-месячных животных резко снижена концентрация ФХ в ядрах /Никитин и др., 1985/, можно предположить, что относительно низкая активность фосфолипаз в ядрах молодых животных – результат ингибирующего действия тиреоидных гормонов, концентрация которых в организме в этот возрастной период превышает уровень 24-месячных животных. Роль фосфолипаз Д ядер клеток печени, по-видимому, сводится к поддержанию определенного уровня ФЛ и их метаболитов в процессе изменения физиологического состояния клетки.

Тиреоидные гормоны и обмен сфингомиелина в клетках печени

Изучение содержания СМ, процесса его деградации и ресинтеза в печени, гепатоцитах и плазматических мембранах клеток нормальных, гипо- и гипертиреозных животных позволило установить, что обмен этого фосфолипида находится под контролем тиреоидных гормонов. Так, развитие гипотиреоза повышает содержание СМ в клетках печени и снижает активность нейтральной сфингомиелиназы, в то же время введение T_4 подопытным животным вызывает обратные изменения изученных показателей /табл.5/.

Таблица 5

Влияние гипо- и гипертиреоза на содержание СМ в печени и плазматических мембранах и активность сфингомиелиназы плазматических мембран клеток печени 24-месячных животных

СМ и активность сфингомиелиназы	!	Норма	!	Гипотиреоз	!	Гипертиреоз
СМ гомогената печени ^а		$8,13 \pm 0,68$		$16,6 \pm 0,45^T$		$5,80 \pm 0,01$
СМ плазматических мембран ^б		$0,109 \pm 0,05$		$0,225 \pm 0,008^T$		$0,067 \pm 0,002$
Активность сфингомиелиназы плазматических мембран ^в		$11,8 \pm 0,10$		$9,55 \pm 0,05^T$		$17,4 \pm 0,60$

а – % от суммы ФЛ; б – нмоль·мкг белка⁻¹; в – нмоль [^{14}C] фосфорилихолина·мг белка⁻¹·мин⁻¹; Т – Р_{норма-гипотиреоз} < 0,05

Следует отметить, что в печени гипотиреоидных животных практически отсутствуют возрастные различия в содержании СФМ между 1-, 3-, 12- и 24-месячными крысами. T_4 не только активизирует процесс деградации экзогенного [^{14}C метил] СФМ, но и фосфолипиды гепатоцитов. Активация под действием гормона сфингомиелиназ плазматических мембран не сопровождается накоплением сфингозина. Его уровень в клетках печени гипертиреоидных животных резко снижается. Тиреоидные гормоны подавляют образование сфингозина при действии на клетки сфингомиелиназы *Staphylococcus aureus* и не изменяют скорость его синтеза из [^{14}C] пальмитоил-КоА.

Настоящими исследованиями установлено, что тиреоидные гормоны активируют процесс синтеза СФМ в плазматических мембранах клеток. Так, при инкубации мембран в среде, содержащей [^{14}C -метил] ФХ и T_4 , происходит деградация ФЛ и образование меченого СФМ. О существовании подобного пути обмена холинсодержащих ФЛ в плазматических мембранах клеток различных тканей сообщали другие авторы /Nappton et al., 1989; Merrill et al., 1990/. Важным является то, что одним из продуктов этой реакции является ДГ.

Процессы синтеза СФМ в мембранах и образования ДГ в клетках печени под действием гормона кратковременны. Снижение интенсивности этих процессов по времени совпадает с всплеском активности эндогенной нейтральной сфингомиелиназы, которая, по-видимому, разрушает значительную часть синтезировавшегося СФМ и, кроме того, в ходе активации сфингомиелиназы активируется синтез ФХ из фосфорилхолина и ДГ. Следует отметить, что T_4 / в условиях *in vitro* / не влияет на процесс синтеза и деградации холинсодержащих ФЛ в клетках печени старых 24-месячных крыс. Учитывая то, что ФЛ и жирные кислоты являются важными компонентами липидного окружения фосфолипаз плазматических мембран / Petkova et al., 1986; Axelrod et al., 1988/, можно полагать, что модификации в старости их липидного состава - важная причина изменения реакции клеток на гормональное воздействие.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что под действием тиреоидных гормонов в плазматических мембранах клеток печени молодых животных происходит активация метаболизма холинсодержащих фосфолипидов. Тиреоидные гормоны, воздействуя на процессы деградации и ресинтеза СФМ и ФХ, участвуют в регуляции в клетках печени уровня таких метаболитов, как ДГ и сфингозин. Важным является то, что под контролем гормонов находятся как начальные этапы образования ДГ, так и терминация этого процесса в ходе актива-

ции сфингомиелиназ.

Роль протеинкиназы С в гормональной регуляции процесса
включения линолевой кислоты в липиды печени

Итак, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что тиреоидные гормоны контролируют в клетках уровень ДГ и сфингозина — регуляторов протеинкиназы С. Активация этого фермента в печени под воздействием эфиров фторбала сопровождается повышением интенсивности включения олеата в общие липиды клеток /Nomura et al., 1989/. В то же время, как показано выше, тиреоидные гормоны оказывают активирующее действие на процесс включения линолевой кислоты в ФЛ и ТГ печени и плазматических мембран. Изменение тиреоидного статуса подопытных животных сопровождается существенными модификациями в клетках уровня ЭХС. Эффект гормонов на обмен жирных кислот проявляется не только *in vivo*, но и при действии физиологических доз T_4 — *in vitro*. Ввиду этого следующая серия экспериментов посвящена изучению роли протеинкиназы С в регулирующем действии тиреоидных гормонов на процесс включения линолевой кислоты в состав ФЛ, ТГ и ЭХС.

Установлено, что экзогенный сфингозин /в концентрации, ингибирующей активность протеинкиназы С / угнетает включение линолевой кислоты в ФЛ и ТГ гепатоцитов крыс и подавляет активирующее действие T_4 на этот процесс /табл.6/. В то же время активатор протеинкиназы С — фторбал-12-миристат-13-ацетат повышает интенсивность ацилирования липидов. Аналог фторболового эфира /фторбал-12-миристат-13-ацетат-4-0-метилловый эфир/ не влияет на обмен линолевой кислоты в печени. T_4 и сфингозин /в условиях *in vitro* / не влияют на процесс синтеза ЭХС в печени.

Накопление в клетках печени под действием $L-T_4$ и $L-T_3$ ДГ по времени совпадает со снижением активности протеинкиназы С цитозоля и значительным повышением активности мембраносвязанного фермента /табл.7/.

В то же время менее активный в метаболическом отношении — $D-T_4$ /Oppenheimer, 1985/ практически не влияет на активность протеинкиназы С клеток печени. Не исключено, что в клетках печени, подобно другим типам клеток /Nishizuka, 1984; Abdel-Latif, 1986; Bonch, Tenenhouse, 1990/, под действием гормона происходит транслокация части протеинкиназ из цитозоля в мембраны, где и происходит их активация под действием соответствующих кофакторов.

Учитывая полученные в настоящей работе данные, а также то, что

Таблица 6

Влияние эфиров фторбала, сфингозина и тироксина на включение $[^{14}\text{C}]$ линолевой кислоты в липиды гепатоцитов крыс 3-месячного возраста /п моль·белка $^{-1}$ за 15 мин/.

Воздействие на клетки		!	ФЛ	!	ТГ	!	ЭХС
Фторбол-12-мири- стат-13-ацетат ^а	контроль		147 ± 13,9		17,3±1,25		4,88±0,11
	опыт		164 ± 0,18 ^Г		32,1±5,1 ^Г		8,05±0,25 ^Г
Сфингозин ^б	контроль		160 ± 4,6		23,6±2,05		3,93±1,45
	опыт		117 ± 8,33 ^Г		16,2±2,80 ^Г		5,69±1,67
Тироксин ^в	контроль		89,2 ± 0,52		21,0±0,0		17,0±0,87
	гормон		98,1 ± 0,50 ^д		24,1±1,16 ^д		11,7±2,63
	гормон +		70,8 ± 0,50		17,1±2,07		10,4±1,07
	сфингозин						

а - 1 мкМ; б - 127 мкМ; в - 0,01 мкМ; Г - $P_{\text{контроль-опыт}} < 0,05$;
д - $P_{\text{контроль-гормон}} < 0,05$.

Таблица 7

Влияние тиреоидных гормонов на активность протеинкиназы С в клетках печени крыс 3-месячного возраста /п моль·10²·мин⁻¹·мг белка⁻¹/.

Источник фермента	!	Контроль	!	L-T ₄	!	Д-T ₄
Цитозоль		32,0 ± 3,00		10,0 ± 3,02 ^а		23,9 ± 0,63
Мембраны		20,8 ± 1,85		194 ± 16,7 ^а		16,7 ± 0,93

а - $P_{\text{контроль}} - L - T_4 < 0,05$

T₄ и T₃ увеличивают в клетках печени концентрацию ионов кальция /Hummelich, Soboll, 1989/, необходимого для проявления проте-

инкиназной активности, можно полагать, что наряду с механизмом действия тиреоидных гормонов посредством их взаимодействия с ядерными рецепторами существует и другой путь, важным звеном которого является взаимодействие T_4 и T_3 с мембранами, приводящее к накоплению ДГ и ФК и к активации протеинкиназы С.

III. Влияние диет на липиды, их обмен и функциональную активность клеток животных различного возраста и тиреоидного статуса

Среди многочисленных факторов среды, оказывающих непосредственное влияние на рост, развитие организма и его продолжительность жизни, особое место принадлежит диетическим воздействиям /Никитин, 1979, 1984; Bidlack, 1986; Kokkonen, Battows, 1986; Фролькис, Мурадян, 1988; Григоров, Козловская, 1988/. Наиболее глубокие изменения липидного обмена происходят при варьировании количества и состава жиров рациона. Учитывая то, что существует тесная взаимосвязь между обменом липидов и тиреоидных гормонов в организме, представляло интерес изучение особенностей влияния диет на липиды печени, тонкой кишки и сыворотки крови крыс различного возраста и тиреоидного статуса. Для этой цели исследовали влияние жирового компонента рациона на состав липидов и обмен их отдельных компонентов в тканях нормальных и гипотиреоидных крыс различного возраста.

Влияние диет на липиды клеток и сыворотки крови нормальных животных различного возраста

Установлено, что введение в рацион подопытных животных 3- и 24-месячного возраста ненасыщенных липидов подсолнечного масла /II группа крыс/ или насыщенных - говяжьего жира /III группа/ не влияет на изменение массы их тела, однако модифицирует состав и обмен липидов в сыворотке крови, клетках ворсинок тонкой кишки, печени и ее отдельных мембранных структур. Наименее изменчивым в ходе эксперимента является липидный спектр /ФЛ, ХС, ЭХС, ТГ, ЖК/ клеток ворсинок тонкой кишки, сыворотки крови и ядер клеток печени молодых животных. Насыщенный и ненасыщенный жир /рациона III и II групп соответственно/ вызывает глубокие изменения в содержании общих ФЛ, отдельных их фракций, ХС и ЭХС в печени 3- и 24-месячных крыс. Обогащение пищи животных жирами независимо от их качества приводит в основном к однотипным изменениям липидного спектра клеток печени животных разного возраста и ядер клеток 24-месячных крыс. При-

меняемые диетические воздействия снижают содержание в печени ФЛ и увеличивают — ХС и ЭХС. В целом в ходе эксперимента существенным образом изменяется возрастная динамика липидного спектра в изученных клетках. Так, ненасыщенный жир рациона /II группы крыс/ сдвигает соотношения между липидами отдельных классов в клетках печени 24-месячных животных в сторону молодых крыс. Подсолнечное масло диеты /II группы/ вызывает в течение двух недель эксперимента снижение содержания ТГ и ХС в сыворотке крови молодых животных по сравнению с крысами других групп /I и III/, что согласуется с многочисленными данными о гиполипидемическом действии ненасыщенных жирных кислот пищи /Тригоров, Козловская, 1989; Karmaly et al., 1989; Mokuno et al., 1990/. Снижение в сыворотке крови уровня ТГ под действием диеты — результат активации в данных условиях липопроотеинлипазы и триацилглицеринлипазы печени /Coiffier et al., 1987/. В то же время снижение под действием подсолнечного масла содержания ХС происходит в результате подавления его продукции, увеличения поглощения клетками некоторых тканей /Turner et al., 1984; Kuo et al., 1989/ и в процессе снижения интенсивности поглощения алиментарного ХС в тонкой кишке /Nicolos et al., 1990/.

Изучение жирнокислотного состава липидов клеток печени, тонкой кишки и сыворотки крови животных различных возрастных групп позволило установить, что наблюдаемые под действием различных рационов изменения отражают модификации жирнокислотного спектра липидов диеты. Увеличение в рационе доли ненасыщенных жиров /II группа/ сопровождается повышением содержания полиеновых и снижением — моноеновых ацилов в липидах изученных клеток и сыворотки крови. В то же время обогащение пищи животных насыщенным говяжьим жиром /III группа/ сопровождается снижением уровня полиненасыщенных жирных кислот. Изменение жирнокислотного состава липидов тонкой кишки, печени и сыворотки крови крыс разного возраста под действием алиментарных факторов приводит в конечном итоге к соответствующим изменениям спектра жирных кислот клеток других органов и тканей организма /Burns et al., 1983; Glatz et al., 1989; Giron et al., 1989/.

Дальнейшие исследования показали, что важная роль в изменении состава жирных кислот липидов клеток в процессе диетических воздействий играет процесс деацилирования—реацилирования липидов различных классов /ФЛ, ТГ и ЭХС/. Увеличение в рационе уровня ненасыщенных жиров активирует как процесс липолиза, так и процесс включения полиненасыщенных жирных кислот в состав липидов ядер клеток

печени /рис.3/. Повышение при этом интенсивности включения линолевой и арахидоновой кислоты в ФЛ клеток и их ядер является одной из причин увеличения в данных условиях в печени уровня полиненасыщенных жирных кислот. Подавление под действием диеты включения в липиды олеиновой кислоты коррелирует с уменьшением ее концентрации в клетках и мембранах в ходе эксперимента. В то же время усиленное под действием рациона II группы включение пальмитиновой кислоты в ФЛ свидетельствует о повышении интенсивности процесса их синтеза *de novo*. Так, установлено, что в клетках печени пальмитиновая кислота включается в состав ФЛ преимущественно в процессе их

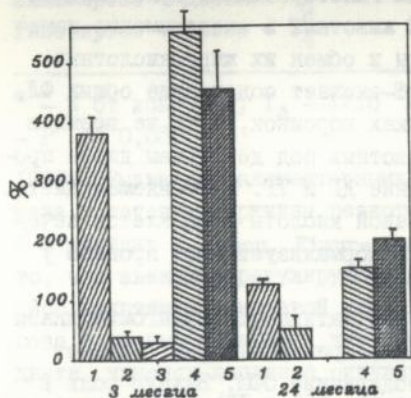


Рис. 3. Влияние подсолнечного масла диеты /рацион II группы/ на деацилирование /1/ и ацилирование /2-5/ липидов ядер клеток печени /% от контроля/. 2 - включение пальмитиновой, 3 - олеиновой, 4 - линолевой и 5 - арахидоновой кислот в липиды.

их синтеза *de novo*, в то время как арахидоновая и другие ненасыщенные жирные кислоты - в ходе реакций деацилирования-реацилирования / Jakobsson et al., 1990/. Замедление под действием подсолнечного масла диеты молодых крыс синтеза ТГ, по-видимому, является результатом подавления в данных условиях активности диацилглицерин-ацилтрансферазы печени в результате снижения в клетках моноеновых жирных кислот. Известно, что олеиновая кислота - сильный активатор этого фермента в печени. / Hillmar et al., 1983/.

Длительное /в течение 8 недель/ содержание животных на рационе /У группа/, липидный компонент которого представлен исключительно подсолнечным маслом, не только приводит к глубоким изменениям состава липидов микросом и клеточного ядра, но и его функциональной активности, что выражается в подавлении активности РНК-полимераз ядер. При этом нарушается нормальный темп роста молодых животных. Ввиду этого для выяснения модифицирующего действия жиров рациона на липидный обмен животных различного тиреоидного статуса в даль-

нейшем использовали более мягкое кратковременное /в течение 2 недель/ воздействие на организм диеты II группы крыс.

Влияние диеты на липиды клеток и их плазматических мембран животных различного тиреоидного статуса

Обогащение пищи гипотиреоидных животных разного возраста подсолнечным маслом не изменяет концентрацию в сыворотке крови T_4 и T_3 и состав липидов клеток ворсинок тонкой кишки и печени 3-месячных животных. В то же время применяемое диетическое воздействие приводит к глубоким изменениям липидного спектра клеток и их плазматических мембран старых 24-месячных гипотиреоидных крыс. Модификация тиреоидного статуса подопытных животных в эксперименте изменяет характер влияния диеты на липиды и обмен их жирнокислотных компонентов в изученных типах клеток: снижает содержание общих ФЛ, ФХ, ФЗА и увеличивает ФИ и ФС в клетках ворсинок. В то же время в печени 24-месячных гипотиреоидных животных под действием диеты происходит снижение уровня ЭХС и повышение ДГ и ТГ. Применяемая диета, снижая интенсивность включения линолевой кислоты в ФЛ клеток печени и ворсинок тонкой кишки, полностью нормализует этот процесс у старых гипотиреоидных животных.

Ненасыщенный жир рациона, увеличивая активность сфингомиелиназы плазматических мембран 24-месячных гипотиреоидных крыс, снижает повышенное в них в данных условиях содержание СФМ. Важную роль в модифицирующем действии диеты на обмен СФМ в плазматических мембранах играет влияние алиментарного жира на липидное окружение сфингомиелиназы.

Диета, содержащая значительные количества ненасыщенных жирных кислот, оказывает сильное модифицирующее действие на процесс включения под действием T_4 линолевой кислоты в ФЛ плазматических мембран молодых гипотиреоидных животных /табл.8/. Липосомы /500 мкМ ФХ/ имитируют подавляющий эффект диеты на активацию под действием T_4 включения жирной кислоты в ФЛ плазматических мембран молодых животных, но не влияют на мембраны старых крыс. Работами /Lester 1990/ установлено, что при обогащении плазматических мембран клеток полиненасыщенными липидами /в условиях *in vivo* и *in vitro* под действием соответствующей диеты или липосом/ изменяются условия для взаимодействия протеинкиназы С в мембранах с ее истинными активаторами - ДГ и эфирами фторбола. Кроме того, известно, что изменение длины и степени насыщенности углеводородной цепи жирнокислотных компонентов ДГ и ФС оказывает глубокое модифицирующее действие на процесс активации этими липидами протеинкиназ /Walker et al.,

Таблица 8

Влияние тироксина, диеты / II группы / на включение $[^{14}\text{C}]$ линолевой кислоты в фосфолипиды плазматических мембран клеток печени гипотиреоидных крыс 3- и 24-месячного возраста

Группы животных	! Возраст крыс, месяцы	
	! 3	! 24
Гипотиреоз + T_4^a	$492 \pm 8,0^B$	$110 \pm 3,0$
Гипотиреоз + диета ^a	$73,7 \pm 4,8^B$	$74,4 \pm 8,6^B$
Гипотиреоз + диета + T_4^b	$53,0 \pm 2,1^B$	102 ± 10

a - % от контроля; T_4 - $1 \cdot 10^{-8}\text{M}$; b - % от гипотиреоз + T_4 ; B - $P < 0,05$.

1990/. Вызванное алиментарными факторами нарушение липидного обмена в печени - причина резкого снижения активности протеинкиназ C в клетках / Katon, Kimura, 1989/. Учитывая эти данные, а также то, что звеном в регулирующем действии тиреоидных гормонов на процесс включения линолевой кислоты в ФЛ мембран является протеинкиназа C, можно полагать, что применяемая в настоящих экспериментах диета, изменяя липидное окружение фермента, жирнокислотный состав ее активаторов /ДГ и ФС/, способствует изменению ответа клетки на гормональное воздействие. Тот факт, что тиреоидные гормоны не вызывают накопления ДГ в клетках печени старых животных, объясняет отсутствие гормонального эффекта /в условиях *in vitro* / на процесс включения линолевой кислоты в ФЛ плазматических мембран 24-месячных крыс. Этим объясняется и отсутствие действия диет и липосом на регуляцию T_4 обмена линолевой кислоты в мембранах старых крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопрос регуляции различных звеньев липидного обмена в процессе постнатального периода онтогенеза в организме является одним из актуальных направлений исследований в области фундаментальных проблем биологии развития и старения. Интерес к проблеме во многом связан с тем, что нарушения состава липидов мембранных структур клетки в различные периоды развития животных и человека неизбежно ведут к глубоким изменениям функциональной активности тканей и, в конечном итоге, приводят к развитию целого ряда патологичес-

ких процессов. Для выяснения путей коррекции метаболических сдвигов необходимо выявление механизмов, лежащих в основе изменений направленности обмена липидов различных классов в онтогенезе.

Сравнительное исследование изменений в постнатальном онтогенезе состава липидов клеток тонкой кишки, печени и ее отдельных мембранных структур – плазматических мембран и клеточного ядра – позволило установить, что глубокие изменения в процессе развития и старения организма содержания ФЛ и ТГ сопровождаются резкими колебаниями уровня различных продуктов их деградации и превращений: ЖК, МГ, ДГ, ЭХС. Впервые показано, что изменения соотношения процессов деградации и ресинтеза липидов в ходе реакций их деацилирования-ацилирования являются важной причиной изменения в онтогенезе состава липидов и их жирных кислот в изученных типах клетки. Установлена тесная взаимосвязь между обменом холинсодержащих фосфолипидов /ФХ и СФМ/ в клетках печени. Активация в старости фосфатидилхолин-специфичных фосфолипаз С клеточного ядра и плазматических мембран – одна из причин резкого увеличения в их составе уровня ДГ.

Проведенные исследования позволили установить возрастные особенности действия тиреоидных гормонов и липидного компонента диет в регуляции обмена липидов в организме подопытных животных. Изменение тиреоидного и пищевого статуса подопытных животных приводит к резким изменениям активности ключевых ферментов обмена жирнокислотных остатков фосфолипидов мембранных структур клетки и обмена холинсодержащих липидов плазматических мембран и клеточного ядра. Важная роль в возрастных модификациях уровня ряда липидов, жирных кислот и их обмена в клетках принадлежит тиреоидным гормонам. Подавление под действием T_4 активности фосфолипазы A_2 гепатоцитов на фоне усиленного использования свободных полиненасыщенных жирных кислот в процессах синтеза ФЛ и ТГ в клетках – причина снижения интенсивности синтеза и содержания простагландина Е в печени. Важным моментом в ингибирующем действии тиреоидных гормонов на активность фосфолипаз А является их действие на белоксинтезирующий аппарат клетки. В то же время активация протеинкиназы С в клетках печени является звеном в регулирующем действии гормонов на процесс включения полиненасыщенных жирных кислот в ФЛ и ТГ. T_4 и T_3 , усиливая обмен холин- и этаноламинсодержащих ФЛ плазматических мембран гепатоцита, вызывают накопление в клетках ДГ, являющихся активаторами протеинкиназы.

С помощью экспериментальных диет и липосом установлено, что особенности липидного спектра плазматических мембран клеток живот-

ных разного возраста играют важное значение в реализации влияния гормона на метаболизм клетки. Диетическое воздействие на организм является действенным физиологическим фактором модификации состава липидов, их обмена и функциональной активности клеток тканей животных различного возраста.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что наиболее глубокие изменения в печени и клетках ворсинок тонкой кишки состава липидов происходят в период между I и 3 месяцами постнатального периода онтогенеза. Однако, если в печени уровень ФЛ и ФХ повышается, а ФИ+ФС, СФМ, ЭХС и ЖК снижается на данном этапе развития, то в клетках тонкой кишки возрастные изменения касаются только нейтральных липидов, ХС и ЖК: содержание ХС и ТГ падает, а ДГ+МГ и ЖК увеличивается к 3-месячному возрасту. Изучение липидов плазматических мембран и ядер клеток печени позволило установить снижение к 24 месяцу постнатального периода онтогенеза по сравнению с более молодыми животными уровня ФЛ. В плазматических мембранах к старости повышается относительное содержание ЭХС, СФМ, МГ+ДГ. Уровень ДГ и ХС в ядрах клеток печени 24-месячных животных в 2 раза выше, чем в ядрах 3-месячных крыс. Содержание полиеновых жирных кислот в липидах клеток печени и тонкой кишки уменьшается, а моноеновых увеличивается в процессе старения животных.

2. Изменения в онтогенезе активности фосфолипазы A_2 клеток печени, их плазматических мембран, ядер и интенсивности включения ненасыщенных жирных кислот в состав ФЛ /повышение к 3 месяцам и снижение к старости/ - важная причина возрастных изменений уровня полиеновых ацилов в липидах клеток печени. В то же время снижение к 3-месячному возрасту уровня синтеза ТГ в присутствии насыщенной пальмитиновой кислоты в клетках ворсинок тонкой кишки является одним из факторов снижения в них в данный возрастной период содержания ТГ и увеличения содержания МГ+ДГ и ЖК. Изменения в онтогенезе / в период между I и 24 месяцами/ активности сфингомиелиназ в клетках печени и их плазматических мембранах - одна из причин возрастных сдвигов уровня СФМ в печени. Активация к старости активности фосфолипаз С в ядрах и плазматических мембранах клеток и триацилглицеринлипаз в печени коррелирует с повышением в них уровня МГ и ДГ.

3. Установлено, что изменение тиреоидного статуса подопытных животных /в процессе введения T_4 или мерказолила/ приводит к глу-

боким модификациям липидного спектра клеток, различным образом выраженным в печени и тонкой кишке крыс I-, 3-, 12 и 24-месячного возраста. Развитие гипотиреоза сопровождается резким снижением содержания ФЛ в изученных типах клеток животных. Гипотиреоз приводит, однако, к повышению, а гипертиреоз — к снижению уровня ФЛ в плазматических мембранах клеток печени как молодых, так и старых крыс. В то же время в ядрах клеток печени и клетках ворсинок тонкой кишки тиреоидные гормоны снижают содержание общих ФЛ только у молодых животных, не влияют на уровень этих липидов в ядрах клеток печени и повышают в клетках ворсинок 24-месячных крыс. Наблюдаемые в клетках печени и тонкой кишки изменения содержания ФЛ в процессе модификации функциональной активности щитовидной железы сопровождаются резкими колебаниями уровня различных продуктов их деградации и превращений: ЛФХ, ЖК, ЭХС, МГ и ДГ.

4. Активность фосфолипаз А плазматических мембран клеток печени не зависит от тиреоидного статуса подопытных животных, в то же время процесс включения насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот в ФЛ находится под контролем тиреоидных гормонов. Возрастные изменения процесса ацилирования ФЛ плазматических мембран во многом зависят от уровня циркулирующих в организме тиреоидных гормонов. Гипотиреоз резко повышает, а введение T_4 подопытным животным снижает активность фосфолипаз A_1 и A_2 клеточного ядра и гепатоцитов крыс. Подавление в клетках печени под действием гормона активности фосфолипаз A_2 на фоне усиленного включения полиненасыщенных жирных кислот в липиды являются важной причиной снижения интенсивности синтеза и содержания простагландина E_2 в печени. Тиреоидные гормоны во многом определяют возрастные особенности обмена жирнокислотных компонентов липидов клеток ворсинок тонкой кишки.

5. Установлено, что под контролем тиреоидных гормонов в организме животных разного возраста находится обмен холин- и этанол-аминсодержащих ФЛ клеток печени, их плазматических мембран и ядер. Выявлено значение тиреоидных гормонов в изменении в онтогенезе уровня СФМ в клетках печени и роль в этом процессе эндогенных сфингомиелиназ плазматических мембран. Установлено также, что при действии T_4 и T_3 на интактные клетки печени и их плазматические мембраны происходит деградация ФХ, ФЭА и образование ДГ, ФК и холина. Одним из путей образования ДГ в гепатоцитах под действием гормонального стимула является его высвобождение в процессе ресинтеза СФМ из ФХ в плазматических мембранах клеток. Накопление в мембранах клеток под действием тиреоидных гормонов ДГ сопровождается активацией мембраносвязанной протеинкиназы С. Установлено, что часть активи-

рукшего эффекта тиреоидных гормонов на процесс включения линолевой кислоты в ФЛ и ТГ клеток печени опосредована их действием на протеинкиназу С.

6. Выявлены возрастные особенности влияния различного режима кормления подопытных животных на липиды и их обмен в клетках печени, тонкой кишки и сыворотки крови. Наименее изменчивым в ходе эксперимента является липидный спектр /ФЛ, ХС, ЭХС, ТГ, ЖК/ клеток ворсинок, сыворотки крови и ядер клеток печени молодых животных. В то же время увеличение в рационе насыщенных и ненасыщенных жирных кислот способствует снижению содержания ФЛ и увеличению ХС и ЭХС в печени животных разного возраста и ядрах клеток 24-месячных крыс. Ненасыщенный жир диеты сдвигает соотношение между липидами отдельных классов в печени старых животных в сторону молодых. Установлено, что состав ФЛ, уровень ХС и его эфиров во многом зависят от количества потребляемого жира. В то же время спектр жирных кислот липидов клеток – отражение качественного состава потребляемых жиров. Увеличение степени ненасыщенности липидов рациона приводит к повышению уровня полиеновых и снижению – моноеновых ацилов в липидах клеток и сыворотке крови. Применяемые диетические воздействия вызывают, в основном, однотипные изменения состава жирных кислот в печени, тонкой кишке и сыворотке крови животных различного возраста.

7. Установлена роль процесса деацилирования-ацилирования липидов ядер клеток печени крыс различного возраста в изменении под действием диет их жирнокислотного спектра. Повышение под влиянием диет уровня деградации и ресинтеза ФЛ в клеточном ядре происходит интенсивнее у молодых животных по сравнению со старыми крысами.

8. Модификация тиреоидного статуса подопытных животных изменяет характер влияния жиров рациона на липиды клеток печени и ворсинок тонкой кишки животных различного возраста. Обогащение пищи ненасыщенными жирами не влияет на состав липидов клеток молодых гипотиреоидных животных, однако оказывает глубокое воздействие на липидный спектр и функциональную активность клеток ворсинок, печени и плазматических мембран старых /24-месячных/ гипотиреоидных крыс. Применяемое диетическое воздействие нормализует обмен линолевой кислоты в ФЛ клеток, увеличивает активность сфингомиелиназы плазматических мембран, а также резко подавляет активирующее действие тиреоидных гормонов на процесс включения линолевой кислоты в ФЛ плазматических мембран гипотиреоидных животных.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Нікітін В.М., Бабенко Н.О. Вікові особливості впливу експериментальних дієт на ріст і розвиток білих щурів та жирнокислотний склад ліпідів клітинного ядра і його функціональну активність // XII з'їзд Укр. фізіол. тов. Тез. доп., 1986, Львів. - С. 293.
2. Нікітін В.М., Бабенко Н.О., Попова Л.Я., Басанец Л.М. Вплив аліментарної лінолевої кислоти на ряд показників ліпідного метаболізму білих щурів різного віку. //XII з'їзд Укр. фізіол. тов. Тез. доп. 1986, Львів. - С. 292-293.
3. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. Старение и гормональная регуляция липидного обмена //Нейрогуморальные механизмы старения. Мат—лы симп. 1986, Киев. - С. 76.
4. Бабенко Н.А. Роль фосфолипаз в регуляции липидного состава клеточного ядра и его функциональной активности //IX Всесоюз. симпозиум. Структура и функции клеточного ядра. - Черногловка, 1987. - С. 145.
5. Бабенко Н.А. Влияние диетических факторов на состояние липидного обмена организма белых крыс разных возрастных групп //Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза. Тез. докл. Харьков, 1987. - С. 18-19.
6. Никитин В.Н., Бабенко Н.А., Резниченко А.А., Росик Г.Г. Возрастные особенности жирнокислотного спектра липидов мембранных структур клеток печени белых крыс //Молекулярные и функциональные механизмы онтогенеза. Тез. докл. Харьков, 1987. - С.137.
7. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. Липиды и липидный обмен в онтогенезе //Успехи совр. биол. - 1987. - Вып. 3 /6/. - С. 334 - 343.
8. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. Влияние диетических факторов на липиды ядер и микросом клеток печени белых крыс //Укр. биох. журн. - 1988. - 60, № 1. - С. 91-96.
9. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. Возрастные особенности липидного состава функционально различных структур гепатоцита // I съезд геронтологов и гериатров УССР. Тез. докл. /Днепропетровск, 1988/. - Киев, 1988. - С. 178.
10. Бабенко Н.А. Возрастные особенности регуляции липидного обмена /У Всесоюз. съезд геронтологов и гериатров. Тез. докл. /Тбилиси, 1988/. - Киев, 1988. - С. 46.
11. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. Тиреоидные гормоны и липидный обмен //Физиол. журн. - 1989. - 35, № 3. - С.91-98.
12. Бабенко Н.А. Возрастные особенности обмена жирнокислотных компонентов ядер клеток печени у крыс под воздействием диетических

факторов // Укр. биохим. журн. - 1989. - 61, № 3. - С. 85-90.

13. Nikitin V.N., Babenko N.A. Age-specific differences in the metabolism of nuclear phospholipid fatty acid components // IIth Nuclear workshop. Program and abstracts (Suzdal., 1989). - Chernogolovka, 1989. - P. 138.

14. Бабенко Н.А. Эндогенные системы обмена ацильных компонентов фосфолипидов ядерных и плазматических мембран гепатоцита // Реконструкция, стабилизация и репарация биологических мембран. Тез. докл. симп. и стенд. сообщен. Благовещенск, 1989. - С. 16.

15. Бабенко Н.А., Филоненко Н.С., Ключкович В.А., Никитин В.Н. Возрастные особенности влияния тиреоидных гормонов на активность фосфолипаз А клеток печени белых крыс // Докл. АН УССР. - 1989. - № 4. - С. 54-56.

16. Бабенко Н.А. Возрастные особенности влияния тиреоидных гормонов на метаболизм насыщенных и полиеновых жирных кислот в плазматических мембранах гепатоцита // Регуляция эндокринных функций в норме и при патологии. Тез. докл. научн. конф. - Харьков, 1989. - С. 7.

17. Бабенко Н.А., Никитин В.Н. Возрастные особенности влияния периодического низкокалорийного питания на липидный состав клеток печени, тонкой кишки, жировой ткани и сыворотки крови белых крыс // Физиол. журн. - 1990. - 36, № 1. - С. 60-65.

18. Нікітін В.М., Бабенко Н.О. Регуляція метаболізму ліпідів в постнатальному онтогенезі // Розвиток фізіології в Українській РСР за 1986-1990 роки. Збірник матер. XIII з'їзду Укр. фізіол. тов. / Харків, 1990/. - Київ: Наук. думка. - 1990. - 2. - С. 44.

19. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. Коррекция липидного обмена в старости с помощью диетических и гормональных воздействий / Гериатрические средства: экспериментальный поиск и клиническое использование. Тез. и реф. докл. Всес. симп. - Киев, 1990. - С. 123.

20. Бабенко Н.А. Участие фосфолипазы Д в образовании фосфатидной кислоты и диацилглицеринов в ядрах клеток печени белых крыс // Всес. симп. Структура и функции клеточного ядра. / Гродно, 1990/. - Москва, 1990. - С. 130.

21. Nikitin V.N., Babenko N.A. Age-specific differences in the metabolism of nuclear phospholipid fatty acid components // Nuclear Structure and Function. The proceeding of the Eleventh Nuclear Workshop, 18-23 Sept., 1989. - New-York: Plenum publishing Corporation. - 1990. - P. 459-462.

22. Бабенко Н.А., Никитин В.Н. Пути образования диацилглицеринов и фосфатидной кислоты в ядрах клеток печени белых крыс // Докл. АН СССР. - 1990. - 313, № 2. - С. 479-482.

23. Бабенко Н.А. Активация фосфолипаз А и С при взаимодействии тиреоидных гормонов с рецепторами плазматических мембран гепатоцита // Всес. симп. Биохимия рецепторных систем. Тез. докл. - Таллинн, 1990. - С. 3.

24. Никитин В.Н., Бабенко Н.А. О роли липидов в механизме действия калорийно ограниченной диеты на продолжительность жизни // Геронтология и гериатрия, 1990. Ежегодник. Превентивная геронтология и гериатрия. - Киев, 1991. - С. 41-48.

25. Бабенко Н.А. Особенности метаболизма насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот липидов клеточного ядра: онтогенетический аспект // X Всес. совещ. по эволюционной физиологии. Тез. докл. - Ленинград: Наука, Ленингр. отд. - 1990. - С. 258.

26. Бабенко Н.А. Влияние тиреоидных гормонов на метаболизм жирнокислотных компонентов липидов плазматических мембран клеток печени крыс разного возраста // Укр. биохим. журн. - 1991. - 63, № 1. - С. 50-55.

27. Бабенко Н.А., Филоненко Н.С., Никитин В.Н. Участие тиреоидных гормонов в регуляции уровня простагландинов группы Е в организме белых крыс // Докл. АН СССР. - 1991, № 3. - С. 141-144.

28. Бабенко Н.А. Регуляция активности сфингомиелиназы и фосфолипазы С плазматических мембран клеток печени крыс разного возраста // Биохимия. - 1991. - 56, вып. 2. - С. 346-353.

29. Бабенко Н.А., Филоненко Н.С., Вильясензор В.З., Никитин В.Н. Стимуляция тиреоидными гормонами активности фосфолипазы Д в гепатоцитах крыс различного возраста и тиреоидного статуса // Докл. АН СССР. - 1991. - 320, № 3. - С. 745-748.

30. Нікітін В.М., Бабенко Н.О., Самойлов В.М., Філоненко Н.С. Вплив тиреоїдних гормонів на утворення сфінгозину в клітинах печінки // УІ Український Біохім. з'їзд. Тез. доп. - ч. I. - 1992. - Київ: Вид-во УСТА. - 1992. - С. 218.

31. Бабенко Н.А., Филоненко Н.С. Влияние тиреоидных гормонов и диацилглицеринов на метаболизм сфингомиелина в ядрах клеток печени крыс разного возраста // Биохимия. - 1992. - 57, вып. 3. - С. 371-377.

Бабенко

Подписано в печать 22.09.92. Формат 60x84/16.
Офсетн.печать. Усл.п.л. 2,3. Уч.-изд.л. 2,3.
Тираж 100. Заказ № 509.

Харьков-108, роталит ХФТИ.

284515

Ab 25.994

AB 25.994