

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ПЕЧЕНИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ ГИБЕРНАЦИИ ЯКУТСКОГО СУСЛИКА *Spermophilus undulatus*

© 2019 г. И.К. Коломийцева, Н.И. Перепелкина

Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: ikolomizeva2@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.07.2019 г.

После доработки 03.07.2019 г.

Принята к публикации 19.07.2019 г.

Исследовано влияние гибернации на количество жирных кислот и моноглицеридов в ткани печени и в плазме крови якутского суслика *Spermophilus undulatus*. Показано, что в ткани печени спящих животных (баут спячки) количество жирных кислот (мкг/мг белка) увеличено в пять раз по сравнению с летним периодом. У активных зимних сусликов (интербаут спячки) количество жирных кислот снижено в два раза по сравнению со спящими. Количество моноглицеридов в печени гибернирующих животных уменьшено в два раза по сравнению с летними животными. Количество белка (мг/г ткани) в печени при гибернации не изменялось. Содержание жирных кислот в плазме крови при гибернации снижалось вдвое, возвращаясь к летним значениям у активных зимних животных. Количество моноглицеридов в плазме крови не изменялось. Концентрация белка в плазме крови при гибернации увеличена на 20% по сравнению с летним периодом. Изменения количества жирных кислот в печени и плазме крови свидетельствует об адаптивной роли жирных кислот в гибернации суслика *S. undulatus*. В печени гибернирующих животных поддерживается высокий уровень жирных кислот при сниженном количестве жирных кислот в плазме крови в период оцепенения. Жирные кислоты печени играют роль в возвращении жирных кислот плазмы к летнему уровню в интербауте спячки. Из анализа результатов следует, что печень играет регуляторную роль по отношению к липидам плазмы, выполняя роль депо жирных кислот при адаптивном снижении концентрации жирных кислот в плазме крови в сезон гибернации. Высокий уровень жирных кислот в печени может обуславливать адаптивные изменения липидного состава внутриклеточных органелл ткани печени при гибернации суслика *S. undulatus*.

Ключевые слова: гибернация, плазма крови, печень, жирные кислоты.

DOI: 10.1134/S0006302919050089

Зимней спячке – естественному гипобиозу млекопитающих в зимний сезон – предшествует предварительная перестройка метаболизма в период подготовки к гибернации, осуществляемой под контролем центральной нервной системы [1]. Важнейшим звеном перестройки служит переход на использование в энергетическом метаболизме липидов взамен углеводов. Основным субстратом энергетического метаболизма при использовании липидов служат свободные жирные кислоты (ЖК) и их метаболиты [2]. При подготовке к спячке жирные кислоты запасаются в виде триглицеридов в жировых депо – в белом и буром жире [3]. Жирные кислоты и моноглицериды освобождаются из триглицеридов под действием липаз, которые активируются в основном в белой и

бурой жировых тканях. Плазма крови служит источником питательных веществ для всех органов и тканей. Свободные жирные кислоты, поступающие в кровь, переносятся плазмой в комплексе с альбуминами [4]. Альбумин плазмы насчитывает семь мест связывания жирных кислот, причем способен концентрировать жирные кислоты с превышением на несколько порядков и легко отдавать их клеткам органов и тканей [5]. Было показано, что у якутского суслика в печени при спячке наблюдается повышенный уровень жирных кислот одновременно с ростом количества жирных кислот и холестерина в органеллах – митохондриях, ядрах и микросомах, – хотя количество холестерина в ткани печени не увеличивается [6–8]. В плазме крови спящих сусликов *Spermophilus lateralis* наблюдали сезонное колебание количества жирных кислот: в начале спячки (ноябрь–декабрь) количество повышалось, однако в

Сокращения: ЖК – жирные кислоты.

январе—феврале падало почти в два раза, а затем снова повышалось [9,10]. Моноглицериды служат источником жирных кислот и глицерола и обладают способностью активировать липазы [4]. Мы поставили своей задачей сопоставить влияние гипбернации на количество жирных кислот и моноглицеридов плазмы крови и печени для выяснения возможной связи между метаболизмом липидов этих органов при спячке мелких млекопитающих, а также для анализа возможного влияния жирных кислот на липидный состав внутриклеточных органелл печени. Исследовали влияния сезона, баута и интербаута спячки (летние, спящие и активные зимние животные) на количество ЖК и моноглицеридов в ткани печени и в плазме крови якутского суслика *S. undulatus*. Обнаружено снижение количества моноглицеридов печени при гипбернации суслика *S. undulatus* и отсутствие влияния на количество моноглицеридов плазмы. Установлено, что направленность изменений количества жирных кислот в печени и плазме крови гипбернантов противоположна. В печени при гипбернации уровень ЖК резко повышен, а в плазме — снижен по сравнению с летним уровнем, возвращаясь к летним значениям в интербауте спячки. Это свидетельствует о регуляторной роли печени в адаптации организма млекопитающего к гипбернации путем депонирования жирных кислот в этом органе для обеспечения роста ЖК плазмы в интербауте спячки. Предложено объяснение изменений липидного состава органелл печени при гипбернации млекопитающих как следствие роста жирных кислот в этом органе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на сусликах *S. undulatus* обоих полов массой 640 ± 43 г в периоды гипбернации (декабрь—март) с 2011 по 2014 гг. Животных отлавливали в конце августа в местах природного обитания (долина реки Лена, Якутия) и доставляли в г. Пушино Московской области. В период активности (сентябрь) сусликов содержали в индивидуальных клетках в специальном помещении, с соблюдением естественного фотопериода и при достаточном количестве пищи и воды. Затем клетки с животными перемещали в темное помещение, где они находились при температуре от 0 до $+2^\circ\text{C}$ до окончания гипбернационного периода. Были задействованы три группы животных: первая группа — летние, которых брали в опыт в июне—июле. Вторая группа — спящие животные, которых декапитировали в январе—феврале в середине цикла спячки (баута) при температуре тела от $1,0$ до $7,0^\circ\text{C}$ (средняя температура тела $4,2^\circ\text{C}$). Третью группу представляли активные зимние суслики, которых провоцировали к пробуждению в январе—феврале. Сусли-

ков извлекали из гнезда в середине цикла (на пятые—шестые сутки спячки, спящие суслики) и переносили в помещение с температурой воздуха ($T_{\text{в}}$), равной $19 \pm 1^\circ\text{C}$. Регистрацию ректальной температуры ($T_{\text{рект}}$) при пробуждении вели посекундно с помощью специализированного датчика RET-2 (Physitemp, США) с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$ и программы ввода в компьютер. Температуру сердца ($T_{\text{с}}$) точно измеряли с помощью датчика RET-3 (Physitemp, США) с точностью $\pm 0,1^\circ\text{C}$ сразу после вскрытия грудной клетки [11]. Активных зимних животных забивали через 24 ч после пробуждения при $T_{\text{тела}} 37^\circ\text{C}$. Для обезглавливания использовали гильотину. Печень гомогенизировали в растворе, содержащем 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, pH 7,4, в соотношении 1 : 1 по объему в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. В кровь добавляли 10%-й раствор динатриевой соли ЭДТА из расчета 20 мкл на 1 мл крови. Форменные элементы крови осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 75 g. Из плазмы и гомогената печени брали аликвоты для определения белка. Липиды из ткани печени и плазмы крови экстрагировали двадцатикратным объемом смеси хлороформ/метанол в соотношении 2:1 по объему и промывали, как описано в работе [12]. Нейтральные липиды разделяли на силикагеле L (5/40) в системе гексан : этиловый эфир : уксусная кислота в соотношении 73 : 25 : 2 по объему. Жирные кислоты и моноглицериды определяли озолением, для построения калибровочной кривой использовали арахидоновую кислоту, количество липидов и белка выражали в мг на 1 мл плазмы или 1 г ткани. Все методы подробно описаны нами ранее [13]. Достоверность различий во всех опытах оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, Tukey Test. Приведены средние данные \pm стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жирные кислоты представляют собой массовый компонент нейтральных липидов печени и плазмы крови, тогда как моноглицериды относятся к минорным компонентам. Количество ЖК и моноглицеридов на мг белка в печени превышает их количество в плазме крови летних сусликов примерно на 30%-50% (табл. 1 и табл. 2). Моноглицериды образуются в основном при действии липаз на триглицериды пищевого происхождения и служат как для ресинтеза ди- и триглицеридов, так и в качестве субстратов энергетического метаболизма [4]. Основными эффектами гипбернации на метаболизм ЖК и моноглицеридов в печени суслика *S. undulatus* является резкое увеличение количества ЖК — почти в пять раз — и снижение количества моноглицеридов в два раза.

Таблица 1. Влияние сезона и баута гибернации на количество жирных кислот, моноглицеридов (мкг липида/мг белка) и белка (мг белка /г ткани) в гомогенате печени суслика *S. undulatus*

	Летние животные	Зимние животные (февраль)	
	$T_{\text{тела}} 37^{\circ}\text{C}$	Спящие, $T_{\text{тела}} 4^{\circ}\text{C}$	Активные, $T_{\text{тела}} 37^{\circ}\text{C}$
Жирные кислоты, мкг /мг белка	46,3 ± 5,8	221 ± 28,5, * $p < 0,05$	119,5 ± 18,8, *# $p < 0,05$
Моноглицериды, мкг /мг белка	5,2 ± 0,6	2,4 ± 0,27, * $p < 0,05$	3,6 ± 0,6, * $p < 0,05$
Белок, мг/г ткани	119,9 ± 6,2	127,5 ± 2,4	122,6 ± 2,2

Примечание. Представлены результаты пяти экспериментов; * – различие достоверно по отношению к летним животным, # – различие достоверно по отношению к спящим животным

Таблица 2. Влияние сезона и баута гибернации на количество жирных кислот, моноглицеридов (мкг липида/мг белка) и белка (мг белка /г плазмы) в плазме крови суслика *S. undulatus*

	Летние животные	Зимние животные (февраль)	
	$T_{\text{тела}} 37^{\circ}\text{C}$	Спящие, $T_{\text{тела}} 4^{\circ}\text{C}$	Активные, $T_{\text{тела}} 37^{\circ}\text{C}$
Жирные кислоты, мкг /мг белка	30,7 ± 4,7	13,4 ± 3,1, * $p < 0,05$	32,4 ± 5,3, # $p < 0,05$
Моноглицериды, мкг /мг белка	3,1 ± 1,1	2,5 ± 0,7	3,1 ± 0,32
Белок, мг/г ткани	49,9 ± 2,1	59,8 ± 0,96, * $p < 0,05$	62,2 ± 1,36*, $p < 0,05$

Примечание. Представлены результаты пяти экспериментов; * – различие достоверно по отношению к летним животным, # – различие достоверно по отношению к спящим животным

Переход к нормотермии при гибернации (активные зимние суслики) сопровождается достоверным снижением количества ЖК, количество моноглицеридов печени при этом не меняется (табл. 1). Увеличение количества жирных кислот в печени гибернантов в сезон гибернации у мелких млекопитающих может быть связано с мобилизацией ЖК жировых депо при переходе энергетического метаболизма на потребление жиров взамен углеводов [2]. Подготовка к спячке сопровождается активацией синтетазы жирных кислот в жировых тканях. Следует отметить, что в печени гибернантов экспрессируются различные микроРНК, активирующие трансляцию иРНК [14], но при этом наблюдается угнетение синтетазы жирных кислот. Снижение количества моноглицеридов печени при гибернации (табл. 1) связано, возможно, с усилением липолиза в печени гибернанта для увеличения количества ЖК. Переход в активное состояние сопровождается достоверным снижением количества ЖК в печени гибернанта, тогда как количество моноглицеридов не меняется (табл. 1). В отличие от печени, в плазме крови суслика *S. undulatus* основным эффектом

спячки на жирные кислоты является уменьшение их количества в два раза по сравнению с летними и возвращение к летнему уровню при пробуждении в интербауте у активных зимних животных. Уменьшение количества ЖК в печени при активном состоянии животных может быть связано с активной секрецией ЖК из печени в кровь. Это увеличение секреции следует из данных о резком росте количества ЖК в плазме крови у активных зимних животных (табл. 2), совпадающее с активацией энергопотребления в тканях гибернанта [2,15]. При другом физиологическом состоянии, связанном с усиленной секрецией липидов, а именно при секреции молока у самок, также наблюдали рост количества жирных кислот в печени и плазме крови у коров в первый месяц периода лактации при усиленной продукции липидов для образования молока. Рост жирных кислот в крови лактирующих коров совпадал с ростом количества липидов в печени [16]. У спящих самок черного медведя в крови в период лактации также наблюдали рост в два раза количества жирных кислот. В этой же работе сообщается об увеличении у спящих животных альбумина плазмы на

33% [16]. Это соответствует нашим наблюдениям, что у суслика в середине периода спячки, при сниженном количестве жирных кислот, происходит рост количества общего белка плазмы крови на 20% (табл. 2). Таким образом, изменения количества жирных кислот в плазме крови гибернантов происходят на фоне изменений количества белков, которое, по данным работы [17], затрагивает альбумины плазмы. При анализе данных о низком содержании ЖК в плазме крови гибернантов в период глубокой и длительной спячки (январь—февраль) следует иметь в виду, что при нагрузке организма маслами и жирными кислотами, при увеличении их концентрации в крови наблюдали повреждение клеток органов и тканей – стресс эндоплазматического ретикулума [18]. При этом индуцируются определенные белки – индикаторы стресса. Индукция белков стресса эндоплазматического ретикулума в тканях спящих сусликов была обнаружена в мозгу, однако не была найдена в печени и других тканях [19]. Таким образом, можно полагать, что печень располагает защитными механизмами, позволяющими выдерживать высокие концентрации жирных кислот в период гибернации. В течение сезона гибернации в плазме крови во время баута спячки поддерживается в два раза более низкий уровень жирных кислот, чем в летний период. Возвращение к уровню летнего периода происходит только в интербауте, который у суслика непродолжителен [15]. Важную регуляторную роль в этом процессе играет накопление жирных кислот в печени.

Можно полагать, что гепатоциты зимнеящих располагают адаптивными изменениями метаболизма, обеспечивающими защиту клеток от токсического действия жирных кислот. В этом плане представляют интерес сведения об изменениях липидного состава органелл гепатоцитов гибернирующего суслика *S. undulatus*. Было показано, что гибернация суслика сопровождается увеличением количества холестерина в органеллах печени (ядерной, митохондриальной и микросомальной фракциях) при отсутствии роста холестерина в ткани печени. Было высказано предположение, что накопление холестерина касается мембран органелл, где холестерин выполняет защитную роль, предохраняя мембранные структуры от токсического действия жирных кислот [20,21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Адаптация теплокровных млекопитающих к переживанию в условиях низких температур и бескормицы затрагивает самые сложные и чувствительные системы жизнеобеспечения. Липиды обеспечивают энергопотребление и структуру живого, поэтому вполне понятен интерес к изуче-

нию метаболизма липидов различных тканей и внутриклеточных структур зимнеящих млекопитающих. В наших исследованиях показано, что печень длиннохвостого суслика адаптирована к длительному переживанию при пятикратном превышении концентрации жирных кислот по сравнению с летним периодом. Пробуждение от спячки протекает с выбросом жирных кислот из печени в плазму крови с последующим восстановлением их концентрации в ткани печени и снижением в плазме крови при погружении в спячку. Сведения о высокой концентрации жирных кислот в печени зимнеящего суслика важны для понимания данных о парадоксальном накоплении холестерина в органеллах печени как адаптации мембран органелл к токсическому действию жирных кислот. Перспективны дальнейшие исследования роли липидов органелл в адаптации организма млекопитающих к гипобиозу и воздействию жирных кислот на мембранные и генетические структуры.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность зав. лабораторией механизмов гипометаболических состояний ИБК РАН, к.б.н. Н.М. Захаровой за предоставление тканей сусликов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. P. Lyman, J. S. Willis, A. Malan, and L. C. H. Wang, *Hibernation and Torpor in Mammals and Birds* (Acad. Press, N-Y., 1987).
2. J. Dark, *Annu. Rev. Nutr.* **25**, 469 (2005).
3. K. L. Drew, C. L. Buck, B. M. Barnes, et al., *J. Neurochem.* **102**, 1713 (2007).
4. А. Н. Климов и Н. Г. Никульчева, *Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. Руководство для врачей* (Питер Ком, СПб., 1999).
5. Ger J. van der Vusse, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24** (4), 300 (2009).
6. Н. Н. Брустовецкий, З. Г. Амерханов, М. В. Егорова и др., *Биохимия* **56** (5), 947 (1991).
7. И. К. Коломийцева, Н. И. Перепелкина и Е. Е. Фесенко, *Докл. РАН* **448** (3), 844 (2013).
8. А. А. Лахина, Л. Н. Маркевич, Н. М. Захарова и др., *Докл. РАН* **469** (1), 108 (2016).
9. C. Yeh, F. Tam, E. Catuira, et al., *Comp. Biochem. Physiol.* **III** (4), 651 (1995).
10. L. Elaine, *Physiol. Genomics* **43**, 799 (2011).
11. Н. М. Захарова, *Фундаментальные исследования* **6**, 1401 (2014).

12. J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).
13. И. К. Коломийцева, Н. И. Перепелкина, И. В. Патрушев и В. И. Попов, *Биохимия* **68**, (7), 954 (2003).
14. D. Lang-Ouellette, P. Jr. Morin, *Mol. Cell. Biochem.* **394** (1–2), 291 (2014).
15. А. И. Ануфриев и И. С. Васильев, *Особенности терморегуляции у длиннохвостого суслика в разные периоды жизни при адаптации животных к холоду* (Наука, Новосибирск, 1990).
16. S. Imhasly, C. Bieli, H. Naegeli, et al., *BMC Veterinary Research* **11**, Art. No 252 (2015). DOI: 10.1186/s12917-015-0565-8.
17. P. J. LeBlanc, M. Obbard, B. J. Battersby, et al., *J. Comp. Physiol. B* **171** (4), 327 (2001).
18. A. M. Nivala, L. Reese, M. Frye, et al., *Metabolism* **62**, (5) 753 (2013).
19. R. Chapman, C. Sidrauski, and P. Walter. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **14**, 459 (1998).
20. Н. И. Перепелкина, Л. А. Фиалковская и И. К. Коломийцева, *Биофизика* **62** (2), 304 (2017).
21. Н. И. Перепелкина и И. К. Коломийцева, *Биофизика* **61** (4), 766 (2016).

Fatty Acids of the Liver and the Blood Plasma During the Hibernation of the Yakutian Ground Squirrel *Spermophilus undulatus*

I.K. Kolomyitseva and N.I. Perepelkina

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Investigated the effect of hibernation on the amount of fatty acids and monoglycerides in the liver tissue and in the blood plasma of the Yakutian ground squirrel *Spermophilus undulatus*. In the liver tissue of sleeping animals (bout hibernation) the amount of fatty acids (μg fatty acids /mg protein) increased by 5 times compared with the summer period. In active winter ones (hibernation interbout), the amount of fatty acids is reduced by 2 times compared with sleeping ones. The number of monoglycerides in the liver of hibernating animals is reduced by 2 times compared with the summer. The amount of protein (mg/g of tissue) in the liver during hibernation did not change. In the blood plasma of animals, hibernation proceeded with the amount of fatty acids reduced by half, returning to summer values in active winter animals. The amount of monoglycerides in the blood plasma did not change. The protein concentration in the blood plasma during hibernation is increased by 20% compared with the summer period. Changes in the amount of fatty acids in the liver and blood plasma indicate the adaptive role of fatty acids in the hibernation of the ground squirrel *S. undulatus*: in the liver of hibernating animals, a high fat level is maintained, with a reduced amount of fatty acid in the blood plasma during torpor. Fatty acids of the liver play a role in the return of fatty acids plasma to the summer level in the hibernation interbout. From the analysis of the results, it follows that the liver plays a regulatory role in relation to plasma lipids, acting as a depot for fatty acids with an adaptive decrease in the concentration of fatty acids in the blood plasma during the hibernation season. A high level of fatty acids in the liver can cause adaptive changes in the lipid composition of the intracellular organelles of the liver tissue during the hibernation of the ground squirrel *S. undulatus*.

Keywords: hibernation, blood plasma, liver, fatty acids