

## ЛИПИДЫ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ГИБЕРНАЦИИ СУСЛИКА *Spermophilus undulatus*

© 2016 г. Н.И. Перепелкина, И.К. Коломийцева

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: ikolomizeva2@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.10.15 г.

После доработки 22.01.16 г.

Зимняя спячка суслика *S. undulatus* сопровождается уменьшением на 20% количества фосфолипидов (мкг фосфолипида на 1 мг белка фракции) в микросомальной фракции печени гибернирующих животных по сравнению с таковым у летних. У гибернирующих сусликов уменьшено количество фосфатидилхолина (моль%) по сравнению с таковым у летних, в бауте спячки увеличено количество сфингомиелина (моль%) по сравнению с активными зимними и летними. В ходе гибернации в микросомальной фракции печени повышено количество холестерина, жирных кислот, моно- и диглицеридов. Резко выраженные сезонные изменения соотношения липид/белок свидетельствуют об участии липидов микросомальной фракций печени в адаптации суслика *S. undulatus* к гибернации.

*Ключевые слова:* липиды, микросомы, печень, суслики, гибернация.

Адаптация некоторых видов млекопитающих к экстремальным условиям внешней среды путем погружения в зимнюю спячку (гибернацию) сопровождается глубокими изменениями липидного обмена [1]. Липидный обмен зимоспящих млекопитающих имеет хорошо выраженный годовой цикл – накопление липидов в летне-осенний период и расходование – в зимний. Этот цикл обусловлен использованием липидов взамен углеводов в энергетическом метаболизме при спячке и находится под контролем центральной нервной системы [2]. При гибернации в печени и крови возрастает количество жирных кислот [3]. Во время зимней спячки животное длительно – до полугода – может находиться в оцепенении, при температуре тела до 4–2°C (баут спячки), прерываемом систематическими короткими, длительностью 24–48 ч, пробуждениями (интербаут) с возвращением к температуре тела 37°C [1]. Избыток жирных кислот в клетках нежировых тканей, превышающий возможности клетки к накоплению жирных кислот, вызывает деструкцию мембран, стресс эндоплазматического ретикулаума (ЭР) и апоптоз [4]. При увеличении количества жирных кислот крови в печени возникает стресс ЭР и активация воспалительных маркеров [5]. Жирные кислоты, выступая через стресс ЭР в качестве инициатора липоапоптоза гепатоцитов

[6], рассматриваются как важный патогенетический фактор при жировых болезнях печени у человека. При стрессе угнетение синтеза белков-шаперонов и накопление незрелых белков индуцирует синтез резидентных белков-шаперонов, обеспечивающих созревание незрелых белков, и их встраивание в мембраны ЭР с одновременной активацией синтеза мембранных липидов [7]. Представляет интерес исследование липидов мембранных структур печени гибернирующих животных, способных переносить высокие концентрации жирных кислот в печени и крови в течение почти полугодового периода зимней спячки. Как полагают авторы работы [8], функция печени играет важную роль в выживаемости гибернантов. Якутский суслик *S. undulatus* уникально приспособлен к переживанию в экстремальных условиях низких температур долгой зимы [9]. Для выяснения способов адаптации органелл к длительному существованию в условиях повышенной концентрации жирных кислот в ткани печени мы исследовали влияние гибернации на общие и индивидуальные фосфолипиды и нейтральные липиды микросомальной фракции печени – жирные кислоты, моноглицериды, диглицериды и холестерин. Установлены глубокие изменения количества липидов в зависимости от сезона года и некоторые отличия при смене функциональных состояний суслика *S. undulatus* (баут–интербаут). В сезон гибернации микросомальная фракция печени обогащена жирными ки-

Сокращение: ЭР – эндоплазматический ретикулум.

слотами, холестерином, моно- и диглицеридами, а количество фосфолипидов существенно уменьшено. Фосфолипидный состав эндоплазматической сети печени незначительно и специфически изменяется в зависимости от сезона и баута спячки. Сезонный рост количества холестерина в органеллах печени при росте жирных кислот и глицеридов может рассматриваться как участие гомеостаза мембран ЭР в адаптации к естественному гипобиозу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Половозрелых сусликов *S. undulatus* с массой тела 400–800 г отлавливали летом в районе г. Якутска. Условия содержания в виварии, мониторинг температуры тела и способы отбора материала описаны нами ранее [10]. В опытах использовали сусликов обоих полов и массой тела 600–850 г. Животных исследовали в летний (июнь–июль) и в зимний (декабрь–февраль) периоды. Зимних сусликов разделили на две группы: 1-я группа – спящие, которых декапитировали в середине баута при температуре тела от 1 до 7°C (средняя температура тела 4,2°C); 2-я группа – активные зимние суслики. Активных зимних животных забивали через 24 ч после пробуждения, при температуре тела 37°C. В ряде опытов состояние сусликов оценивали по температуре тела и частоте сердцебиений. Для биохимических исследований сусликов декапитировали с помощью гильотины. После декапитации температуру тела сусликов оценивали с помощью датчика электротермометра в области сердца. Все процедуры с животными проводили в соответствии с требованиями Комиссии по этике ИБК РАН и Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (European Communities Council Directive 86/609/ЕЕС). Сусликов декапитировали согласно правилам, принятым в ИБК РАН [11]. Печень гомогенизировали в растворе, содержащем 0,25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4, при соотношении 1:10 по объему в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. После осаждения фракций легких митохондрий и лизосом из супернатанта при 15000 g в течение 20 мин, осаждали микросомальную фракцию центрифугированием при 105000 g в течение 1 ч [12]. Чистоту фракций оценивали с помощью маркерных ферментов. Примесь цитоплазматических мембран в микросомальной фракции, судя по активности 5'-нуклеотидазы, составляла не более 2,2%, примесь митохондрий, оцененная по активности сукцинатдегидрогеназы, составляла 6,5%. Для

определения количества белка использовали взятые аликвоты.

Методы выделения, разделения и определения индивидуальных липидов были описаны нами ранее [10]. Липиды экстрагировали двадцатикратным объемом смеси хлороформ/метанол при соотношении 2:1 по объему и промывали по Фолчу. Фосфолипиды разделяли методом тонкослойной хроматографии на силикагеле Н (60 × 0,2 мм, Merck, Германия), в системе метилацетат:*n*-пропанол:хлороформ:метанол:0,25 % КСl (25:25:25:10:9 по объему). Количество фосфолипидов определяли по неорганическому фосфору после их сжигания. Нейтральные липиды разделяли на силикагеле L (5/40) в системе гексан:этиловый эфир:уксусная кислота, 73:25:2 по объему. Жирные кислоты, моно- и диглицериды определяли озонированием по Маршу, для построения калибровочной кривой использовали арахидоновую кислоту [13]. Количество холестерина определяли по реакции Либермана–Бурхарда, количество белка – по Лоури. Количество фосфолипидов рассчитывали по калибровочной кривой с ортофосфатом, затем показатели переводили в микрограммы умножением на 25 (из расчета усредненного молекулярного веса фосфолипидов, равного 800). Величины относили к 1 мг белка фракции или выражали в процентах к общему фосфору фосфолипидов. Достоверные различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA Tukey Test. Приведены средние значения ± стандартная ошибка.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В субкомпартментах эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи осуществляются основные процессы синтеза и транспорта липидов. При избыточной нагрузке жирными кислотами в мембранах эндоплазматической сети клеток млекопитающих развивается стресс ЭР [4]. В микросомальной фракции печени якутских сусликов, как и в микросомальной фракции печени крыс, массовыми фосфолипидами являются фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин (табл. 1). Третье место по массе у сусликов занимает фосфатидилинозитол, в отличие от микросомальной фракции неокортекса сусликов и крыс, где третьим по массе является фосфатидилсерин [10]. Фосфолипидный состав микросомальной фракции гибернарующих сусликов изменен по сравнению с летними: так, при гибернации количество фосфатидилхолина снижено на 20%, количество сфингомиелина у спящих сусликов увеличено по сравнению с летними и с активными зимними (табл. 2).

**Таблица 1.** Влияние сезона и баута гибернации на количество липидов (в мкг липида на 1 мг белка) в микросомальной фракции печени якутского суслика *S. undulatus*

Липиды	Летние суслики (температура тела 37°C)	Зимние суслики	
		активные (температура тела 37°C)	спящие (температура тела 4°C)
Общие фосфолипиды	500,7 ± 12,6	413,7 ± 21,0*	443,8 ± 11,3*
Сфингомиелин	22,2 ± 2,5	20,5 ± 1,2	25,7 ± 1,6
Фосфатидилхолин	297,1 ± 10,1	202,5 ± 10,7*	197,1 ± 8,0*
Фосфатидилсерин	17,0 ± 1,2	16,6 ± 0,4	16,1 ± 1,4
Фосфатидилинозитол	54,5 ± 1,8	42,1 ± 1,3*	41,1 ± 3,7*
Фосфатидилэтаноламин	125,0 ± 4,2	113,5 ± 8,2	132,2 ± 7,4
Холестерин	8,1 ± 0,3	39,0 ± 2,2*	37,2 ± 1,3*
Жирные кислоты	23,6 ± 2,8	56,4 ± 10,9*	53,5 ± 7,5*
Моноглицериды	3,6 ± 0,2	10,5 ± 0,6*	8,0 ± 0,3* #
Диглицериды	2,0 ± 0,2	5,3 ± 0,7*	3,9 ± 0,3*
Белок микросомальной фракции, мг на 1 г ткани	8,4 ± 0,8	7,9 ± 0,2	7,8 ± 0,3

Примечания. Число экспериментов  $n = 4$ ; \* – различие достоверно по сравнению с летними животными,  $p < 0,05$ ; # – различие достоверно по сравнению с активными зимними животными,  $p < 0,05$ .

**Таблица 2.** Влияние сезона и баута гибернации на фосфолипидный состав (в моль% к общему количеству фосфолипидов) микросомальной фракции печени суслика *S. undulatus*

Фосфолипиды	Летние суслики (температура тела 37°C)	Зимние суслики	
		активные (температура тела 37°C)	спящие (температура тела 4°C)
Сфингомиелин	4,4 ± 0,4	4,9 ± 0,05	5,7 ± 0,3* #
Фосфатидилхолин	59,4 ± 1,7	48,7 ± 1,4*	44,7 ± 1,8*
Фосфатидилсерин	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,3	3,6 ± 0,3
Фосфатидилинозитол	10,9 ± 0,6	10,1 ± 0,3	9,2 ± 0,7
Фосфатидилэтаноламин	25,1 ± 1,4	27,3 ± 1,6	29,5 ± 1,3

Примечания. Число экспериментов  $n = 4$ ; \* – различие достоверно по сравнению с летними животными,  $p < 0,05$ ; # – различие достоверно по сравнению с активными зимними животными,  $p < 0,05$ .

Можно полагать, что изменения фосфолипидного состава свидетельствуют об изменении структуры мембран эндоплазматического ретикула у гибернирующих животных. Возрастные сфингомиелина в бауте спячки может быть отнесено к защитным реакциям против активного кислорода: показано, что сфингомиелин способствует ригидизации мембраны и задерживает латеральную диффузию свободных радикалов [14]. В сезон гибернации количество общих фосфолипидов на 1 мг белка микросомальной фракции уменьшено на 20%, из них фосфатидилхолина – на 40% и фосфатидилинозитола – на 30% по сравнению с летними (табл. 1). Снижение количества фосфолипидов

в микросомальной фракции печени гибернирующих сусликов совпадает со снижением и модуляцией экспрессии генов и глубоким подавлением синтеза белков в печени, в том числе интегральных белков мембран [15]. Микросомальная фракция печени гибернирующих якутских сусликов обогащена нейтральными липидами, и хотя рост количества жирных кислот менее выражен, в пять раз увеличено количество холестерина. Существенно увеличено количество моно- и диглицеридов в сезон гибернации. В бауте спячки несколько снижается количество моноглицеридов по сравнению с интербаутом (табл. 1), как свидетельство участия моноглицеридов в функциональных изменениях при

спячке. Представляет интерес сопоставить изменения в липидах микросомальной фракции печени при гибернации с признаками развития стресса ЭР. Стресс ЭР и проявление отклика на развернутые белки (UPR – unfolded protein response) сопровождается накоплением шаперона – глюкозозависимого белка GRP78. В печени, почках, сердце, легких и скелетных мышцах спящего суслика *S. tridecemlineatus* накопления белка GRP78 при спячке не обнаружено, однако белок GRP78 был найден в головном мозгу гибернирующего суслика [16]. Есть основания полагать, что в эндоплазматической сети печени суслика *S. undulatus* в условиях гибернации – при резком увеличении количества жирных кислот – также не проявляются признаки стресса ЭР. Отсутствие индукции белка GRP78 при гибернации может совпадать с ростом количества холестерина в ЭР. Следует отметить, что у суслика *S. undulatus* в микросомальной фракции неокортекса при гибернации (где был найден белок GRP78) не обнаружено сезонных изменений количества холестерина. При этом было установлено влияние оцепенения на количество холестерина в микросомальной фракции неокортекса: у спящих зимних сусликов количество холестерина резко уменьшалось по сравнению с активными зимними и летними животными [10]. В микросомальной фракции почек гибернирующего суслика *S. undulatus* количество холестерина было увеличено в три раза по сравнению с летними животными. Вязкость мембраны ЭР почек зимних сусликов *S. undulatus* по сравнению с летними животными не изменялась. Показана также сезонная реструктуризация белков ЭР почек гибернирующего суслика [17]. Возможно, что реструктуризация белков и рост количества холестерина представляют собой звенья адаптивных реакций, противодействующих развитию стресса ЭР при накоплении жирных кислот, диглицеридов и моноглицеридов. Повышение количества жирных кислот, моно- и диглицеридов в микросомальной фракции печени (табл. 1) гибернирующих сусликов может обусловить адаптивный рост количества холестерина для сохранения гомеостаза мембран и подавления стресса ЭР. Жирные кислоты и диглицериды способны индуцировать образование гексагональных и кубических структур в фосфолипидах, увеличивая проницаемость мембран. Увеличение областей контактов способствуют переносу белков, липидов и ионов кальция. Жирные кислоты с высокой эффективностью взаимодействуют с мембранами, снижая проницаемость и усиливая межмембранные взаимодействия [14,18]. Показано, что холестерин служит ограничителем об-

ластей взаимодействия, тогда как некоторые белки, напротив, способствуют их расширению [19]. Можно полагать, что рост количества холестерина имеет адаптивный характер и направлен на сохранение мембранного гомеостаза.

Как подчеркивается в работе [20], важнейшей особенностью фенотипа гибернирующих млекопитающих является устойчивость их органов и тканей к повреждающим воздействиям. Можно полагать, что сезонные изменения количества липидов микросомальной фракции печени якутского суслика обусловлены адаптацией мембран к переходу на использование липидов в качестве субстратов энергетического обмена. Изменения структуры мембран играют роль в устойчивости печени гибернантов к экстремальным условиям окружающей среды. Ряд органов, в том числе и печень гибернирующих сусликов, значительно более устойчивы к реперфузии и хранению на холоде, чем органы летних сусликов [21].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Гибернация вызывает глубокие сезонные изменения количества липидов (мкг липида на 1 мг белка) микросомальной фракции печени якутского суслика *S. undulatus*: обеднение фосфолипидами и резкое обогащение нейтральными липидами. Фосфолипидный состав микросомальной фракции печени гибернантов изменен в сторону снижения доли основного фосфолипида мембран – фосфатидилхолина. Различия в бауте и интербауте спячки в микросомальной фракции печени обнаружены для содержания сфингомиелина (моль%) – рост у спящих, а также для количества моноглицеридов – снижение у спящих сусликов по сравнению с зимними активными. Можно полагать, что изменения липидного состава органелл печени формируются при подготовке к спячке и имеют адаптивный характер. Отсутствие признаков стресса ЭР в печени гибернирующих сусликов при накоплении жирных кислот, моно- и диглицеридов и холестерина может быть связано с ролью холестерина как регулятора межмембранных взаимодействий. Исследования влияния гибернации на регуляцию состава мембранных липидов печени перспективно для поисков методов коррекции липотоксичности и нарушений липидного и углеводного обмена млекопитающих и человека.

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией гипометаболических состояний ИБК РАН канд. биол. наук Н.М. Захаровой за предоставление препаратов печени сусликов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-00993-а).

### 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. N. N. Brustovetsky, M. V. Egorova, D. Yu. Gnutov, et al., *FEBS Lett.* **305**, 15 (1992).
4. R. T. Brookheart, C. I. Michel, and J. E. Schaffer, *Cell Metab.* **10**, 9 (2009).
5. A. M. Nivala, L. Reese, M. Frye, et al., *Cell Metab.* **62**, 753 (2013).
6. Ю. О. Шульпекова, *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии* **22**, 45 (2012).
7. T. P. W. McMullen, A. H. Lewis, and R. N. McEnhaley, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 345 (2009).
8. J. A. Baker and F. van Breukelen, *Comp. Hepatology* **8**, 2 (2009).
9. А. И. Ануфриев и И. С. Васильев, в сб. *Адаптация животных к холоду*, под ред. Н. Г. Соломонова (Наука, Новосибирск, 1990), сс.15–20.
10. I. K. Kolomiytseva, N. I. Perepelkina, A. D. Zharikova, and V. I. Popov, *Comp. Biochem. Physiol. B* **151**, 386 (2008).
11. А. А. Кудрявцева, *Регламентация работы с лабораторными животными* (ОНТИ НЦБИ АН СССР, Пушкино, 1983).
12. D. Johnson and H. Lardy, in *Methods in enzymology* (N.Y., 1967), p. 574.
13. B. Marsh and D. B. J. Weinstein, *Lipid Res.* **7**, 574 (1966).
14. P. V. Subbaiah, V. S. Subramanian, and K. J. Wang, *Biol. Chem.* **274**, 36409 (1999).
15. D. S. Hittel and K. B. Storey, *J. Exp. Biol.* **205**, 1625 (2002).
16. R. Chapman, C. Sidrauski, and P. Walter, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **14**, 459 (1998).
17. Е. В. Басевич, О. Д. Лопина и А. М. Рубцов, *Биохимия* **75**, 1601 (2010).
18. L. Chernomordik, M. M. Kozlov, and J. J. Zimmerberg, *Membr. Biol.* **146**, 1 (1995).
19. M. Fujimoto, T. Hayashi, and T.-P. Su, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 635 (2012).
20. J. C. Rose, L. E. Epperson, H. V. Carey, and S. L. Martin, *Comp. Biochem. Physiol. Part D* **6**, 163 (2011).
21. S. L. Lindell, S. L. Klahn, T. M. Piazza, et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, 473 (2005).

## Lipids of Liver Microsomal Fraction during Hibernation in Ground Squirrel *Spermophilus undulatus*

N.I. Perepelkina and I.K. Kolomiytseva

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

Winter sleep of the ground squirrel *S. undulatus* is accompanied by a 20% decrease in phospholipid content ( $\mu\text{g}$  phospholipid per 1 mg of the protein) in microsomal fractions of the liver in hibernating animals as compared with that in summer-active animals. In hibernating ground squirrels phosphatidylcholine level (mol%) is lower than that in summer-active animals, in the torpor bout the amount of sphingomyelin (mol%) is higher compared to that in winter- and summer-active animals. During hibernation in the microsomal fraction of the liver the levels of cholesterol, fatty acids, mono- and diglycerides are elevated. Pronounced seasonal changes in the ratio of lipid/protein indicate the involvement of lipids of liver microsomal fraction in adaptation of the ground squirrel *S. undulatus* to hibernation.

*Key words: lipids, microsomes, liver, ground squirrels, hibernation*